

Resistência das *Pseudomonas* à Ciprofloxacina e sua Relação com a Saúde Ambiental

Karina Luisa Sertich Arruda

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Farias Cunha

2013/2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL**

Karina Luisa Sertich Arruda

**RESISTÊNCIA DAS *PSEUDOMONAS* À CIPROFLOXACINA E
SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE AMBIENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina para Conclusão do Curso
de Graduação em Engenharia Sanitária e
Ambiental.

Orientador: Prof. Guilherme Farias
Cunha, Dr.

Florianópolis
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL

**RESISTÊNCIA DAS *PSEUDOMONAS* À CIPROFLOXACINA E
SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE AMBIENTAL**

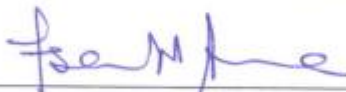
KARINA LUISA SERTICH ARRUDA

Trabalho submetido à Banca Examinadora como parte
dos requisitos para Conclusão do Curso de Graduação
em Engenharia Sanitária e Ambiental - TCC II

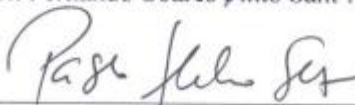
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Guilherme Farias Cunha, Dr.
(Orientador)



Prof. Fernando Soares Pinto Sant'Anna, Dr.



Prof. Pablo Heleno Sezerino, Dr.

FLORIANÓPOLIS (SC)
DEZEMBRO/2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, Criador e Salvador do mundo, pois foi somente por sua graça que cheguei aqui e pude provar de sua vontade boa, agradável e perfeita.

Aos meus pais, Antonio e Maria de Lourdes, pelos valores ensinados, como honestidade, dedicação, zelo e persistência. Ainda, agradeço por me ensinarem a acreditar em mim mesma e pelo apoio incondicional.

Ao meu querido irmão Diego, pela parceria de toda uma vida. Ainda, à minha avó Mariazinha em especial, pelo amor, apoio e paciência durante todos os anos na universidade e ao meu padrinho Jairo por estar sempre presente em minha vida. Ainda, a todos meus familiares.

Ao meu professor orientador Dr. Guilherme Farias Cunha, pelos conhecimentos compartilhados durante as aulas e reuniões.

Ao meu professor orientador Dr. Tyler Radniecki, sem o qual este trabalho não teria sido realizado. Agradeço pela enorme oportunidade de fazer parte de seu laboratório na San Diego State University, por toda a ajuda prestada durante todos os momentos de pesquisa e pela amizade. A todos os amigos do laboratório na SDSU, Tanner, Issa, Rachelle, Lucy, Cameron, Tyler e outros, especialmente Mark e Jenny, pela colaboração na pesquisa, pela amizade e por tornar o ano de intercâmbio tão mais especial. À CAPES pela oportunidade de estudar no exterior.

A todos meus adoráveis amigos espalhados mundo afora, simplesmente por sua amizade. Em especial, aos amigos da Engenharia Sanitária & Ambiental, Camila, Chéelsea, Cibelle, Fernando, Laís (*in memoriam*), Paulo e Raul, por todos os anos de estudos juntos e pelos bons momentos.

Aos professores da UFSC por partilharem seus conhecimentos e possibilitarem a formação de novos profissionais.

Por último, e de modo algum menos importante, ao Eng. Lucas Maciel, pelo amor, carinho, dedicação, tempo, paciência. Por toda a ajuda, especialmente com as análises estatísticas e dicas ao escrever. Ainda, por me incentivar a seguir em frente quando já não me restava disposição.

Meus sinceros agradecimentos a todos.

RESUMO

Fruto do consumo diário de antibióticos pelo homem, é possível encontrar traços de antibióticos em rios e efluentes, provenientes da rede de esgoto, produto do metabolismo humano que o processa. Nestes mesmos rios e efluentes encontram-se bactérias. Esta combinação pode resultar em um desenvolvimento de uma resistência a esses antibióticos por parte das bactérias. O objetivo do presente trabalho é encontrar a relação entre a exposição ao antibiótico, em diferentes concentrações, e o surgimento de organismos resistentes a este. Esta relação foi estudada para as bactérias da espécie *Pseudomonas putida*, com comportamento análogo ao da bactéria mais nociva, a *Pseudomonas aeruginosa*. As *Pseudomonas putida* foram expostas a um antibiótico chamado Ciprofloxacina e as exposições foram diárias e mantidas a diferentes concentrações de antibiótico, na faixa de 0,001953 ppm a 0,1875 ppm. Regularmente foram realizados testes de Concentração Inibitória Mínima, os quais indicam a quantidade necessária de antibiótico para a completa eliminação das bactérias. Ao longo de quatro meses, foi possível observar um crescimento desta concentração mínima, o que indica um aumento da resistência dos organismos ao antibiótico aplicado. Foi testada também a situação onde as bactérias eram removidas da exposição diária. As populações testadas foram duas, previamente expostas a 0,125 ppm e 0,1875 ppm. Nestes casos, ao longo de três meses, foi possível observar que não há perda significativa da resistência já adquirida no espaço de um mês.

Palavras-chave: Saúde ambiental; Resistência a antibióticos; Concentração Inibitória Mínima; *Pseudomonas sp.*

ABSTRACT

As a consequence of the daily consumption of medicine, it is possible to find traces of antibiotics in water bodies and effluents, coming from the sewage system as products of the human metabolism. In these same water bodies, bacteria are found. This combination might result in the development of resistance to antibiotics on those bacteria. This research aims to find a relationship between the exposition to antibiotics, in different concentrations, and the appearance of resistant organisms. This relationship was evaluated for the specie *Pseudomonas putida*, which presents a similar behavior to the more dangerous specie *Pseudomonas aeruginosa*. The bacteria *Pseudomonas putida* were exposed to an antibiotic called Ciprofloxacin and the exposition was maintained at a daily rate and at different concentrations, within the range of 0.001953 ppm to 0.1875 ppm. Minimum Inhibitory Concentration tests were performed regularly, which express the necessary amount of antibiotics to eliminate the bacteria altogether. Within four months, it was possible to observe an increase of this minimum concentration, indicating the increasing resistance of the *Pseudomonas putida* to Ciprofloxacin. A scenario where the bacteria were removed from the daily exposition was also experimented. Two populations were tested, the ones previously exposed to 0.125 ppm and 0.1875 ppm. In these cases, a significant loss of resistance could not be found in the time span of three months.

Keywords: Environmental health; Resistance to antibiotics; Minimum Inhibitory Concentration; *Pseudomonas sp.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Meio nutritivo líquido usado nas placas de 96 alvéolos	38
Figura 2 – Ágar nutritivo usado em discos de Petri.....	38
Figura 3 – Placa de 96 alvéolos.....	39
Figura 4 – Agitador rotativo com controle de temperatura	40
Figura 5 – Cabine de biossegurança com raios UV para esterilização do ambiente interno.....	41
Figura 6 – <i>Layout</i> da placa onde foi feito o cultivo de bactérias expostas a Ciprofloxacina na primeira fase de pesquisa	42
Figura 7 – <i>Layout</i> da placa onde foi feito o cultivo de bactérias previamente expostas a Ciprofloxacina na segunda fase de pesquisa ...	44
Figura 8 – <i>Layout</i> da placa onde foi feito o cultivo de bactérias reexpostas a Ciprofloxacina na terceira fase de pesquisa.....	46
Figura 9 - <i>Layout</i> modelo da placa de teste de CIM.....	48
Figura 10 - Exemplo de gráfico com o crescimento das bactérias vs. concentração de CIP.....	49
Figura 11 – Leitor de microplacas.....	50
Figura 12 - Intervalo de 95,45% de confiança, para uma repetitividade de 2σ	52
Figura 13 - Três amostras teóricas com mesmo desvio padrão e médias diferentes	54
Figura 14 - Distribuição do branco em unidades de DO600	56
Figura 15 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,001953 ppm CIP	58
Figura 16 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,003906 ppm CIP	58
Figura 17 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,007813 ppm CIP	59
Figura 18 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,03125 ppm CIP	60
Figura 19 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,125 ppm CIP	60
Figura 20 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,1875 ppm CIP	61
Figura 21 - Comparação dos resultados de CIM ao longo do tempo entre as populações expostas a 0,001953 ppm CIP, 0,03125 ppm CIP e 0,1875 ppm CIP	63

Figura 22 - Comparação das linhas de tendência para os resultados de CIM ao longo do tempo entre as populações expostas a 0,001953 ppm CIP, 0,03125 ppm CIP e 0,1875 ppm CIP	63
Figura 23 - Exemplo de teste de Concentração Inibitória Mínima	64
Figura 24 – Resultados de teste de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta a 0,125 ppm CIP e também a mesma população que parou de ser exposta após um mês de testes	65
Figura 25 – Resultados de teste de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta a 0,1875 ppm CIP e também a mesma população que parou de ser exposta após um mês de testes.....	66
Figura 26 - Resultados de teste de CIM para a população de controle .	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para rejeição da hipótese nula (Adaptado de MONTGOMERY, 2003)	53
Tabela 2 - Tabela de t de Student	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
SDSU	San Diego State University
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket - Digestor Anaeróbio de Fluxo Ascendente
UV	Ultra Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

σ	Desvio padrão da população
H_0	Hipótese nula
H_1	Hipótese alternativa
Z	Escore Z
z	Escore z
α	Nível de significância
δ	Distância hipotética entre amostras
T	Escore T
t	Escore t
μ	Média
t_α	Escore t para nível de significância α
Z_α	Escore Z para nível de significância α
S	Desvio padrão da amostra
n	Graus de liberdade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1	As Espécies de <i>Pseudomonas</i>	26
3.1.1	Semelhanças entre as espécies <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	28
3.2	A Relação das <i>Pseudomonas</i> com o Homem e os Antibióticos utilizados na Terapêutica.....	28
3.2.1	Aminoglicosídeos	29
3.2.2	Carbapenemas	30
3.2.3	Cefalosporinas	30
3.2.4	Fluoroquinolonas.....	30
3.2.5	Ciprofloxacina.....	31
3.3	Risco de Saúde Ambiental.....	31
3.4	Antibióticos no Meio Ambiente no Brasil e no Mundo.....	33
3.5	Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) ...	35
4	METODOLOGIA	37
4.1	Local da Pesquisa	37
4.2	Meio de Cultivo e Cultivo de Bactérias.....	37
4.3	Etapas de Pesquisa.....	41
4.3.1	Primeira Etapa	41
4.3.2	Segunda Etapa	43
4.3.3	Terceira Etapa.....	45
4.4	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47
4.5	Leitor de Microplacas	49
4.6	Coleta e Análise Estatística de Dados	50
4.6.1	Remoção de <i>Outliers</i>	51

4.6.2	Inferência Estatística para Duas Amostras.....	52
5	RESULTADOS	55
5.1	Resultados das Populações Expostas – Primeira Etapa.....	55
5.2	Resultados das Populações de Exposição Interrompida – Segunda Etapa.....	64
5.3	Resultados das Populações Reexpostas – Terceira Etapa	66
5.4	Resultados dos Testes de CIM do Controle	66
5.5	Resultados da Esterelização	67
6	CONCLUSÕES	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A - Tabela de t de Student.....	75

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, ainda a vasta maioria das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) não possui equipamentos ou métodos capazes de remover substâncias como hormônios e antibióticos das águas residuárias. Quando o efluente tratado, que contém os resíduos de antibióticos eliminados através da urina, é lançado em algum corpo hídrico, estes produtos químicos podem entrar em contato com alguma bactéria presente no meio ambiente onde o efluente foi lançado e modificar algumas características da bactéria. Certas espécies, como a *Pseudomonas putida* e a *Pseudomonas aeruginosa*, são bactérias comuns encontradas na água e no solo e que ao entrarem em contato com o efluente podem acabar sendo diariamente expostas aos antibióticos. Esta exposição diária pode ativar seus mecanismos biológicos de resistência, tornando-as, com o tempo, “superbactérias”. No caso das espécies anteriormente citadas, que são patógenas oportunistas dos seres humanos, a resistência adquirida aos antibióticos pode tornar-se um problema de saúde ambiental.

O presente trabalho de conclusão de curso tem por objetivo principal verificar se realmente as espécies *Pseudomonas putida* e a *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de adquirir resistência a certos tipos de antibióticos, tais como Ciprofloxacina, e obtendo-se um resultado positivo, o trabalho também investiga quais são as condições em que isto ocorre.

A pesquisa para determinação da capacidade da espécie *Pseudomonas putida* de adquirir resistência a certos tipos de antibióticos foi realizada no Laboratório de Engenharia Ambiental do Departamento de Engenharia Civil, Engenharia de Construção e Engenharia Ambiental da Universidade de San Diego State, localizada na Califórnia, Estados Unidos. A pesquisa foi feita por um grupo de três estudantes e foi supervisionada pelo Professor Tyler Radniecki, PhD. Houve três fases de pesquisa laboratorial, nas quais se testou primeiramente a capacidade da espécie bacteriana de adquirir resistência sem nunca ter sido exposta antes ao antibiótico. Em um segundo momento testou-se a capacidade da espécie de perder a resistência uma vez que cessaram as exposições diárias. Por último testou-se a capacidade da espécie de readquirir resistência ao mesmo antibiótico com a volta de exposições. Procurou-se utilizar variadas concentrações de antibióticos, desde as mais baixas até concentrações mais altas.

O método utilizado para a determinação de aumento de resistência foram os Testes de Concentração Inibitória Mínima, os quais devem ser realizados frequentemente e ao longo de todo o período de pesquisa. Estes testes devem ser feitos de modo a saber qual é a concentração mínima de antibiótico que elimina toda a população bacteriana testada, e se esta concentração aumenta ao longo do tempo, o que indica que as bactérias estão adquirindo resistência.

A partir desta pesquisa foram obtidos dados como os efeitos no meio ambiente de concentrações residuais de antibióticos provindas de efluentes, sendo estes supostamente tratados e que em teoria não deveriam causar impactos ambientais negativos. Estes dados poderão ser utilizados para justificar a exigência de padrões mais rigorosos de lançamentos de efluentes na legislação brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral verificar se a capacidade das espécies *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* de se tornarem resistentes a antibióticos, especificamente a Ciprofloxacina, pode ser um problema de saúde ambiental.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar os diversos tipos de *Pseudomonas*, especialmente as espécies *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, e identificar sua relação com o homem;
- ✓ Identificar os diversos tipos de antibióticos usados no tratamento de doenças relacionadas às espécies de *Pseudomonas* que são patogênicas e quais são as suas concentrações residuais em efluentes e águas superficiais;
- ✓ Descobrir como a espécie *Pseudomonas putida* adquire resistência sob a influência do antibiótico Ciprofloxacina nas concentrações de 0,001953 ppm a 0,1875 ppm no espaço de quatro meses;
- ✓ Descobrir se a espécie *Pseudomonas putida* perde sua resistência à Ciprofloxacina quando a exposição a este antibiótico é interrompida por três meses;
- ✓ Descobrir como a espécie *Pseudomonas putida* readquire resistência à Ciprofloxacina quando exposta novamente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 As Espécies de *Pseudomonas*

As *Pseudomonas* são bactérias gram-negativas, aeróbicas, baciliformes e em sua maioria dotadas de flagelos. (GILARDI, 1971) Há um grande número de espécies de *Pseudomonas*, sendo a mais importante a *Pseudomonas aeruginosa*. Com exceção da *P. aeruginosa*, raramente as *Pseudomonas* causam doenças. Elas são, porém, capazes de causar infecções oportunistas e são vistas como bactérias contaminantes. Assim sendo, a importância de encontrar estas bactérias em material clínico depende da situação do paciente. (RAY; RYAN, 2004)

As *Pseudomonas* são consideradas bactérias ubíquas, ou seja, são onipresentes. Estudos feitos por Cho e Tiedje (2000) são um exemplo disto. Estes autores fizeram experimentos com amostras de solos de quatro continentes e encontraram ao todo 238 isolados de *Pseudomonas* em 38 amostras de solo. As *Pseudomonas* também podem ser encontradas na rizosfera, a região onde o solo e as raízes de plantas entram em contato. Segundo Sorensen, Jensen e Nybroe (2001) as *Pseudomonas* são um grupo de espécies importantes no controle biológico de microfungos na rizosfera.

Certas espécies também podem ser encontradas na água e esgoto, como é o caso da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo Mena e Gerba (2009) a *P. aeruginosa* é frequentemente encontradas em águas superficiais como lagos e rios, apesar de não ser encontrada normalmente em água potável. Esta espécie possui capacidade de colonização a partir da formação de biofilmes e é capaz de sobreviver até mesmo em água destilada. Isto demonstra que esta espécie pode ser encontrada em ambientes oligotróficos. Por outro lado, esta bactéria também pode ser encontrada em ambientes de alta carga de nutrientes como águas residuárias e o corpo humano.

As *Pseudomonas* podem, ainda, ser encontradas em ambientes hospitalares, especialmente a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Para Wolska, Kot e Jakubczak (2012) esta espécie é um patógeno ubíquo, prevalente em ambientes hospitalares, que pode causar graves infecções hospitalares, particularmente entre pacientes imuno-comprometidos.

Entre as espécies de *Pseudomonas* mais conhecidas estão a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Pseudomonas putida*. A primeira, segundo Shen, Ma e Liang (2012), é um patógeno ao ser humano com uma

resistência intrínseca a um grande número de antibióticos usados na terapia clínica. Já de acordo com a publicação de Ray e Ryan (2004) a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie versátil em se tratando de necessidades de energia e crescimento. Ela é capaz de usar moléculas simples, como a amônia e o dióxido de carbono, como fontes de nitrogênio e carbono. Assim sendo, esta espécie não requer meios de crescimento enriquecidos para sobreviver e ela também é capaz de sobreviver em ambientes com temperaturas que variam de 20 a 42°C. Ainda, esta espécie é capaz de sobreviver em ambientes com alta concentração salina. Apesar de que o ideal para um crescimento ótimo é um ambiente aeróbio, esta espécie é capaz de sobreviver e se multiplicar lentamente em ambientes anaeróbicos se houver nitrato presente para funcionar como aceptor de elétrons. A *Pseudomonas aeruginosa* é a responsável pela maior parte de infecções produzidas em seres humanos e o número total de infecções produzidas por outras espécies de *Pseudomonas* é muito menor que o número de infecções produzidas apenas pela *P. aeruginosa*.

Ainda de acordo com Ray e Ryan (2004), a *Pseudomonas aeruginosa* é encontrada na água, solo e vários tipos de vegetação em todo o planeta. Esta espécie já foi isolada inclusive na garganta e fezes de 2 a 10% de seres humanos saudáveis. As taxas de colonização de *P. aeruginosa* são maiores em pacientes hospitalizados por outro lado. Infecções devidas a *Pseudomonas aeruginosa* são raras em pessoas saudáveis, mas são umas das causas mais importantes de infecções invasivas em pacientes hospitalizados com doenças graves, tais como leucemia, fibrose cística e queimaduras. A habilidade desta espécie de sobreviver e proliferar em ambientes com quantidades mínimas de nutrientes pode resultar em graves contaminações. As *Pseudomonas* já foram encontradas em medicamentos, fluidos hospitalares estéreis e até mesmo desinfetantes. Na maioria dos casos, quando há infecção por parte da *Pseudomonas aeruginosa* no trato respiratório, uma vez estabelecida, é quase impossível erradicá-la. Este tipo de infecção é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nestes pacientes.

Já a espécie *Pseudomonas putida* é uma bactéria saprófita metabolicamente versátil, que tem um potencial considerável para aplicações em biotecnologia. (NELSON *et al*, 2002) Por outro lado, para Horii, Muramatsu e Inuma (2005) esta espécie é um bacilo Gram-negativo não fermentador, e é um patógeno oportunista para os seres humanos. De acordo com Kim *et al* (2012), as *P. putida*, do grupo de espécies de *Pseudomonas* fluorescentes, assim como outras espécies

Gram-negativas não fermentadoras, são organismos frequentemente encontrados no meio ambiente e se pensava que eram de baixa patogenicidade. Estudos feitos por estes autores demonstraram altos índices de mortalidade após infecções nosocomiais (hospitales), em que 7 de 18 pacientes morreram devido a bacteremia por *Pseudomonas putida*.

3.1.1 Semelhanças entre as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida*

No estudo de Jatsenko *et al* (2010) foram feitos testes de resistência à Rifampicina, um antibiótico, com as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida*. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que ambas as espécies possuem mecanismos de resistência ao antibiótico bastante semelhantes, especialmente quando as colônias destas bactérias são criadas a uma mesma temperatura, visto que possuem uma sequência genética bastante parecida. Isto permite que sejam feitos estudos com a *Pseudomonas putida*, que é menos nociva à saúde, e aplicar os resultados também à *Pseudomonas aeruginosa*, observadas certas limitações.

3.2 A Relação das *Pseudomonas* com o Homem e os Antibióticos utilizados na Terapêutica

Conforme já mencionado por autores como Ray e Ryan (2004), várias espécies de *Pseudomonas* podem ser encontradas no corpo humano e são patógenas oportunistas dos seres humanos, ou seja, atacam normalmente pessoas com baixa imunidade.

A *Pseudomonas aeruginosa* é particularmente virulenta, ou seja, provoca graves efeitos no organismo. Esta bactéria precisa normalmente de algum meio para vencer as defesas do organismo humano, como uma ferida, e então ela inicia a infecção. (RAY; RYAN, 2004)

Esta espécie é capaz de causar infecções extraintestinais, urinárias, respiratórias, na pele, nos olhos, ouvidos etc. Ela também está associada com pneumonia, necrose alveolar, invasão vascular, infartos e bacteremia. (RAY; RYAN, 2004)

Entre as bactérias patogênicas conhecidas, a *Pseudomonas aeruginosa* é um dos organismos mais consistentemente resistente a vários antimicrobicos. Esta espécie é normalmente resistente a Penicilina, Ampicilina, Cefalotina, Tetraciclina, Cloranfenicol,

sulfonamidas e aminoglicosídeos. Muitos esforços já foram direcionados à criação de antibióticos capazes de combater as *Pseudomonas*. Alguns tipos de aminoglicosídeos são efetivos, apesar da crescente resistência que vem ocorrendo. Também são utilizados antibióticos da classe carbapenema e a Ciprofloxacina. Tem-se tentado criar vacinas contra a *Pseudomonas aeruginosa* para pacientes imuno-comprometidos, mas ainda estão em fase de teste. (RAY; RYAN, 2004) Wolska, Kot e Jakubczak (2012) apontam em seus estudos que as *Pseudomonas aeruginosa* afetam pacientes com infecções gastrointestinais, urinárias e respiratórias, bem como pacientes com queimaduras, feridas, câncer e pacientes em unidades de tratamento intensivo. Estes autores afirmam que em torno de 10% das infecções nosocomiais são devidas a *Pseudomonas aeruginosa*.

Em relação à espécie *Pseudomonas putida*, os autores Horii, Muramatsu e Iinuma (2005) afirmam que esta pode ser responsável por bacteremia e septicemia em pacientes neonatais, neutropênicos e com câncer, bem como pacientes com infecções do trato urinário. Conforme já mencionado pelos autores Kim *et al* (2012), as infecções hospitalares por *Pseudomonas putida* podem ter altos índices de mortalidade.

Entre as classes de antibióticos utilizadas para tratar infecções causadas por *Pseudomonas putida* e/ou *Pseudomonas aeruginosa* pode-se citar certos tipos de fluoroquinolonas e carbapenemas. (HORII; MURAMATSU; IINUMA, 2005) Também são utilizados certos tipos de aminoglicosídeos e cefalosporinas. (MESAROS *et al*; 2007)

Segundo Keen e Patrick (2013), antibióticos são compostos que incluem drogas utilizadas na medicina, biocidas e desinfetantes que podem alterar a função e a estrutura de comunidades microbianas.

A seguir apresentam-se algumas das classes de antibióticos mais utilizadas contra as espécies de *Pseudomonas* citadas neste trabalho.

3.2.1 Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antibióticos que exibem capacidade *in vitro* de atuar contra uma grande variedade de bactérias gram-negativas de grande importância clínica, tais como as *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella spp.*, e *Pseudomonas spp.*, bem como *Staphylococcus aureus* e alguns *streptococci*. (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003)

Estes fármacos exibem várias características que os tornam úteis como agentes antimicrobianos, tais como a atividade bactericida dependente da concentração, efeitos pós-antibióticos, relativa previsibilidade de efeitos farmacocinéticos e sinergismo com outros antibióticos. Por causa de seu sinergismo, este tipo de antibiótico é normalmente usado associado a algum outro tipo de agente antimicrobiano. (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003)

Seu princípio de funcionamento consiste em ligar-se ao ribossomo bacteriano e inibir a síntese proteica da bactéria. (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003)

3.2.2 Carbapenemas

Carbapenemas são antibióticos que foram criados nos anos 80, derivados da Tienamicina. Imipenem e Meropenem foram os primeiros membros desta classe de antibiótico e tinham um amplo espectro de atividade antimicrobiana que incluía *Pseudomonas aeruginosa*, o que os tornavam adequados para o tratamento de infecções nosocomiais. (PEREZ; DUIN, 2013)

3.2.3 Cefalosporinas

As cefalosporinas são uma subclasse de antibióticos β -lactâmicos e eram antibióticos muito utilizados no tratamento de infecções comuns como bronquite, otite, pneumonia e celulite. Contudo, o aparecimento de organismos resistentes a antibióticos requer que se faça atualmente uma escolha do antibiótico a ser usado após uma avaliação cuidadosa da situação. (KELKAR; LI, 2001)

3.2.4 Fluoroquinolonas

Fluoroquinolonas, também chamadas de quinolonas, incluem antibióticos como Norfloxacin, Ciprofloxacina, Pefloxacina, Enoxacina, Fleroxacin, Temafloxacina, Lomefloxacina, Tosufloxacina, Difloxacina, entre outros. Esta classe de antibiótico tem amplo espectro de atividade antibacteriana e vários antibióticos dentre esta classe exibem propriedades farmacocinéticas favoráveis, o que permite o tratamento de infecções bacterianas sistêmicas. Entre seus princípios de atividade antibacteriana está a inibição da síntese de DNA. (WOLFSON; HOOPER, 1989)

As fluoroquinolonas estão entre os antibióticos mais comumente prescritos para pacientes nos EUA. O aumento do uso de fluoroquinolonas nos últimos anos tem coincidido com o firme aumento de resistência a fluoroquinolonas por parte de bactérias gram-negativas em unidades de tratamento intensivo. (WERNER *et al*, 2011)

3.2.5 Ciprofloxacina

A Ciprofloxacina é um antibiótico da classe das quinolonas, que difere de outras quinolonas por ter um resíduo de ciclopropil na posição 1 de seu núcleo de quinolona. Por causa da pobre absorção gastrointestinal, outros antibióticos como ácido nalidíxico e Norfloxacin são usados apenas para tratar infecções urinárias e intestinais. A Ciprofloxacina, porém, oferece melhor absorção, tem ampla distribuição em tecidos e amplo espectro em atividades *in vitro* contra bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *staphylococci*. Estas características da Ciprofloxacina permitem que o médico trate oralmente várias infecções que previamente requeriam terapia parenteral. Isto quer dizer que a Ciprofloxacina tem duas grandes vantagens: pacientes com certos tipos de infecções não necessitam agora serem admitidos em hospitais para fazer a terapia parenteral e em certos casos pacientes em hospitais podem retornar aos seus lares mais cedo fazendo a terapia oral. Dentre as atuais quinolonas, a Ciprofloxacina é uma das mais potentes contra bacilos gram-negativos. (LOUIE *et al*, 1994)

3.3 Risco de Saúde Ambiental

Saúde ambiental é um dos mais amplos campos de estudo de Engenharia Sanitária e Ambiental. Segundo a agência Americana Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1998, *apud* FRUMKIN, 2010), saúde ambiental é o ramo de saúde pública que protege contra os efeitos de riscos ambientais que podem afetar adversamente a saúde ou o equilíbrio ecológico essencial à saúde humana e à qualidade do meio ambiente.

Neste conceito encaixa-se o risco que superbactérias podem representar para os seres humanos. Conforme Vargas e Toro (2010), superbactérias são bactérias que demonstram um aumento da sua resistência a agentes antimicrobianos. Já agentes antimicrobianos são compostos que podem alterar a função e a estrutura de micróbios. Isto

inclui drogas utilizadas na medicina, biocidas e desinfetantes. (KEEN; PATRICK, 2013)

O aumento de resistência das bactérias, ainda segundo Keen e Patrick (2013), é um fenômeno natural que se tem tornado mais intenso com o uso de antibióticos. Para estes autores, antibióticos são “poluentes emergentes” que merecem atenção especial devido à sua bioatividade e capacidade de alterar a estrutura e função de comunidades microbianas. Para Wainwright e Amaral (2013), a atual terapia química, que emprega antibióticos para lidar com as bactérias patogênicas, é falha, devido à grande adaptabilidade que as bactérias possuem e que as torna resistentes aos antibióticos. Para estes autores, o uso de antibióticos está deixando de ser efetivo e ainda só acrescenta ao atual problema de bactérias capazes de se tornarem resistentes.

O problema de que as bactérias resistentes deixam de responder ao tratamento com antibióticos é especialmente grave em pacientes internados em hospitais. Um estudo com a espécie *Pseudomonas putida* reportou que houve uma grande taxa de mortalidade entre os pacientes de um hospital que foram infectados por esta espécie, que havia tornado-se resistente ao antibiótico usado. (KIM *et al.*, 2012).

Nos estudos de Horii, Muramatsu e Iinuma (2005) verificou-se a capacidade da espécie *Pseudomonas putida* de se tornar resistente a vários tipos de antibióticos testados dentre as classes de carbapenemas e fluoroquinolonas. Em outro estudo, Kim *et al* (2012) verificou uma resistência particularmente alta aos antibióticos de classe carbapenema por parte da espécie *Pseudomonas putida*.

Também a espécie *Pseudomona aeruginosa* possui grande capacidade de adquirir resistência a antibióticos, seja por mecanismos internos ou por aquisição de genes resistentes. (MESAROS *et al*, 2007) Nos estudos de Mesaros *et al* (2007) é possível verificar que a espécie *Pseudomonas aeruginosa* adquiriu resistência aos antibióticos Ceftazidima, Cefepima, Imipenem, Meropenem, Gentamicina, Tobramicina, Amicacina e Ciprofloxacina.

Ainda segundo Mesaros *et al* (2007), a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é atualmente uma das bactérias patogênicas mais problemáticas, devido à sua complexidade de genes e capacidade de adquirir resistência a diversos tipos de antibióticos. Já para Kim *et al* (2012), as *Pseudomonas putida* são bactérias que previamente eram consideradas de baixa virulência, mas que recentemente têm-se tornado resistentes a vários tipos de antibióticos, como as carbapenemas, e têm

sido responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade em pacientes infectados.

3.4 Antibióticos no Meio Ambiente no Brasil e no Mundo

Antibióticos estão presentes como contaminantes em uma série de sistemas ambientais. Dentre os chamados “contaminantes emergentes”, resíduos de antibióticos estão incluídos devido a suas atividades biológicas. Antibióticos são introduzidos no meio ambiente por uma série de caminhos que incluem esgoto doméstico, resíduos de produção agropecuária, aquicultura, aplicação direta em algumas plantas, efluentes industriais de produtos farmacêuticos, *run-off* da agricultura e a disposição de resíduos da produção de etanol. (KEEN; PATRICK, 2013)

Estudos feitos por Ebert *et al.* (2011 *apud* Keen e Patrick, 2013) utilizaram Enrofloxacin e Ciprofloxacin em quatro espécies aquáticas autotróficas e observou-se que a Enrofloxacin não pôde inibir o crescimento de certas macrófitas, apesar de que houve algumas respostas de toxicidade por parte das macrófitas expostas a Ciprofloxacin nas mesmas concentrações ambientais relevantes.

A falta de detecção de antibióticos em amostras retiradas do meio ambiente, especialmente aquelas com grande concentração de matéria orgânica, não significa que não há resíduos de antibióticos presentes. A diversidade química e estrutural dos antibióticos dificulta a detecção destes componentes no meio ambiente. Processos como biodegradação, fotodegradação, complexação química ou formação de quelatos e adsorção por matéria particulada alteram a concentração de resíduos de antibióticos, que já não podem ser medidos com confiança em amostras providas do meio ambiente. (KEEN; PATRICK, 2013)

De acordo com Michael *et al.* (2013 *apud* Keen e Patrick, 2013) a descarga de efluentes de estações de tratamento de esgoto representam importantes fontes de contaminantes no meio ambiente. Estações de tratamento de esgoto (ETE) são descritas por estes autores como uma das principais localizações para antibióticos e resistência bacteriana a estes.

Ainda de acordo com Keen e Patrick (2013), as condições ambientais, que estão sempre mudando, influenciam os processos biológicos, químicos, físicos e ecológicos que mantêm o equilíbrio dos ecossistemas. Faz, portanto, parte da natureza das bactérias também uma grande adaptabilidade às condições presentes em seu ambiente. Quando

a atividade humana amplifica a exposição destas bactérias a condições que não eram previamente encontradas na natureza, ocorre o desenvolvimento de resistência a estas condições, como por exemplo os antibióticos.

Ainda, há evidências de que não só o meio ambiente atua como reservatório para resistência a antibióticos, como também como meio de disseminação desta resistência, no caso de genes resistentes. Por estes motivos, as bactérias cada vez mais estão adaptando-se com rapidez e facilidade às novas drogas criadas para uso médico ou na agricultura. Bactérias resistentes, genes resistentes, moléculas de antibióticos, entre outros fatores, que estão presentes diariamente no meio ambiente resultantes da poluição, portanto, comprovam este impacto ambiental causado pelo ser humano. (KEEN; PATRICK, 2013)

Estudos feitos por Giger *et al* (2003) procuraram determinar as concentrações de variados antibióticos em efluentes. Os estudos foram feitos com quinolonas e utilizou-se o método de cromatografia líquida com detecção por fluorescência para verificar a presença dos antibióticos na amostra. Dentre os 10 antibióticos investigados, o Norfloxacin e a Ciprofloxacina foram encontrados em efluentes de estações de tratamento de esgoto doméstico. Dentre as quinolonas, estes dois antibióticos citados acima correspondem a 90% dos antibióticos consumidos na Suíça. Segundo estes autores, o consumo anual de quinolonas na Suíça é razoavelmente constante e em torno de 4,8 toneladas, sendo que estas 4,8 toneladas de fluoroquinolonas são apenas uma pequena parte do total de antibióticos usados em animais e seres humanos apenas na Suíça.

Nos estudos de Giger *et al* (2003) monitorou-se a concentração de antibióticos ao longo do processo de tratamento de efluentes. Os autores afirmam que nas ETE houve uma redução do fluxo de quinolonas em torno de 88 a 92 %, devido à adsorção pelo lodo de esgoto. Amostras de lodo de esgoto de várias ETE na Suíça demonstraram uma concentração de Ciprofloxacina e Norfloxacin em torno de 1,4 a 2,4 mg/kg de lodo seco. Desta maneira, os antibióticos também podem atingir o solo, ao se utilizar o lodo de esgoto em aplicações terrestres. Assim como no Brasil, até a época do artigo os autores disseram não haver qualquer normativa da União Europeia em relação a farmacêuticos em efluentes e lodos de esgoto. Porém na Suíça proibiu-se em 2003 o uso de lodo de esgoto para aplicações na agricultura.

Também nos estudos de Giger *et al* (2003) monitorou-se a carga de fluoroquinolonas que chegava a um dos principais rios da Suíça, o rio Glatt. A concentração das quinolonas Ciprofloxacina e Norfloxacinó variava de 255 ng/l a 568 ng/l (ou seja, aproximadamente de 0,000255 ppm a 0,000568 ppm) em esgoto bruto e variava de 36 a 106 ng/l em efluentes tratados, devido à adsorção pelo lodo de esgoto. Já no rio Glatt encontraram-se concentrações em torno de 19 ng/l. Por outro lado, em efluentes brutos hospitalares obteve-se uma concentração superior a 10 µg/l de Ciprofloxacina. Neste efluente hospitalar verificou-se uma redução de duas ordens de magnitude ao passar por tratamento. Ainda assim, os autores recomendam que haja padrões e leis mais rigorosos em relação aos farmacêuticos, especialmente em se tratando de lodos de esgoto.

Em estudos feitos no Brasil por Prado *et al* (2008), testou-se, entre outras coisas, a suscetibilidade da bactéria *K. pneumoniae* a diversos antibióticos, entre eles a Ciprofloxacina. Amostras de um efluente de um hospital no Rio de Janeiro foram colhidas em quatro pontos, a saber: esgoto bruto, esgoto após passar por reator UASB, esgoto após passar por três filtros anaeróbios (efluente tratado), e lodo de esgoto. Os resultados obtidos por estes autores mostram que quase a metade das 43 estirpes de *K. pneumoniae* nas amostras demonstraram resistência a um ou mais antibióticos. No caso da Ciprofloxacina, em torno de 10% das bactérias demonstraram resistência. A conclusão dos autores é que o tratamento de efluentes do hospital em questão deixa a desejar em termos de remover organismos patogênicos e que o manejo e a disposição final dos efluentes e do lodo de esgoto do hospital podem comprometer a saúde pública, contaminando o solo e a água e podem ainda facilitar a disseminação de microrganismos resistentes no meio ambiente.

3.5 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Segundo Wiegand, Hilpert e Hancock (2008), Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração, em mg/l, do agente antimicrobiano que previne o crescimento visível de um microrganismo sob condições definidas.

A determinação da CIM pode ser utilizada para monitorar o desenvolvimento de resistência a antibióticos. Os métodos mais utilizados para determinação da CIM são os métodos de diluição em

água e diluição em caldo nutritivo. (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008)

Neste trabalho utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo nutritivo baseada naquela descrita por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008), cujo procedimento está resumido a seguir:

- (i) Preparar diluições do(s) antibiótico(s) que serão utilizadas no experimento. Os antibióticos devem ser esterilizados.
- (ii) Inocular a bactéria e o antibiótico em placas de 96 alvéolos contendo o caldo nutritivo, conforme a diluição desejada. Deve-se colocar primeiro o antibiótico seguindo uma ordem de menor concentração para maior concentração para evitar contaminações.
- (iii) Para que haja uma certa precisão nos resultados, deve-se sempre incluir uma coluna de controle.
- (iv) Este procedimento deve ser feito em um meio estéril para evitar contaminações e sempre quando não estiver em ambiente estéril deve-se colocar a tampa na placa de 96 alvéolos para evitar contaminações. Misturar bem e colocar uma etiqueta para identificar a bactéria testada, o(s) antibiótico(s) e sua(s) concentrações.
- (v) A placa deve ser posta em uma incubadora por 16 a 20 horas, a uma temperatura em torno de 37°C. Caso haja problema com baixa umidade, deve-se colocar uma toalha de papel úmida na incubadora.
- (vi) No dia seguinte, deve-se contar as colônias formadas. A CIM será aquela que inibe o crescimento visível da bactéria testada.

4 METODOLOGIA

Com o intuito de alcançar o objetivo principal do trabalho, fez-se uma pesquisa laboratorial para determinação da resistência a antibióticos da espécie *Pseudomonas putida*, e, por conseguinte, tem-se também uma ideia da resistência da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Após o levantamento de dados desta pesquisa, foi realizada uma análise estatística dos dados obtidos em laboratório.

4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa para determinação da capacidade da espécie *Pseudomonas putida* de adquirir resistência foi realizada no Laboratório de Engenharia Ambiental do Departamento de Engenharia Civil, Engenharia de Construção e Engenharia Ambiental da Universidade de San Diego State, localizada na Califórnia, Estados Unidos. A pesquisa teve duração de seis meses e foi realizada durante o ano de 2012 a partir de um intercâmbio do programa Ciência sem Fronteiras, patrocinado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O grupo de pesquisa consistiu de uma brasileira estudante de Engenharia Sanitária e Ambiental, dois alunos da graduação de Engenharia Ambiental da universidade de San Diego State e um professor orientador da mesma universidade norte-americana, sendo que a pesquisa foi financiada pelo Departamento de Engenharia Civil, Engenharia de Construção e Engenharia Ambiental da universidade de San Diego State.

4.2 Meio de Cultivo e Cultivo de Bactérias

O primeiro passo para conduzir esta pesquisa foi de prover um meio de crescimento com os nutrientes necessários para a espécie estudada. Dois tipos diferentes de meio de cultivo foram utilizados: Meio nutritivo líquido, usado em placas e frascos, e Ágar nutriente (sólido), usado em discos de Petri. Todos os meios de cultivo eram preparados e posteriormente esterilizados em autoclave.

O Ágar nutriente foi usado no início da pesquisa, de modo a produzir discos de Petri para formar colônias e contá-las. O meio nutritivo líquido foi usado na maior parte da pesquisa, para o cultivo diário das bactérias e usado também em testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM). As figuras 1 e 2 mostram os meios nutritivos

de cultivo de bactérias. A figura 3 mostra as placas usadas para os testes de CIM e cultivo de bactérias.

Figura 1 – Meio nutritivo líquido usado nas placas de 96 alvéolos



Fonte: A autora

Figura 2 – Ágar nutriente usado em discos de Petri



Fonte: A autora

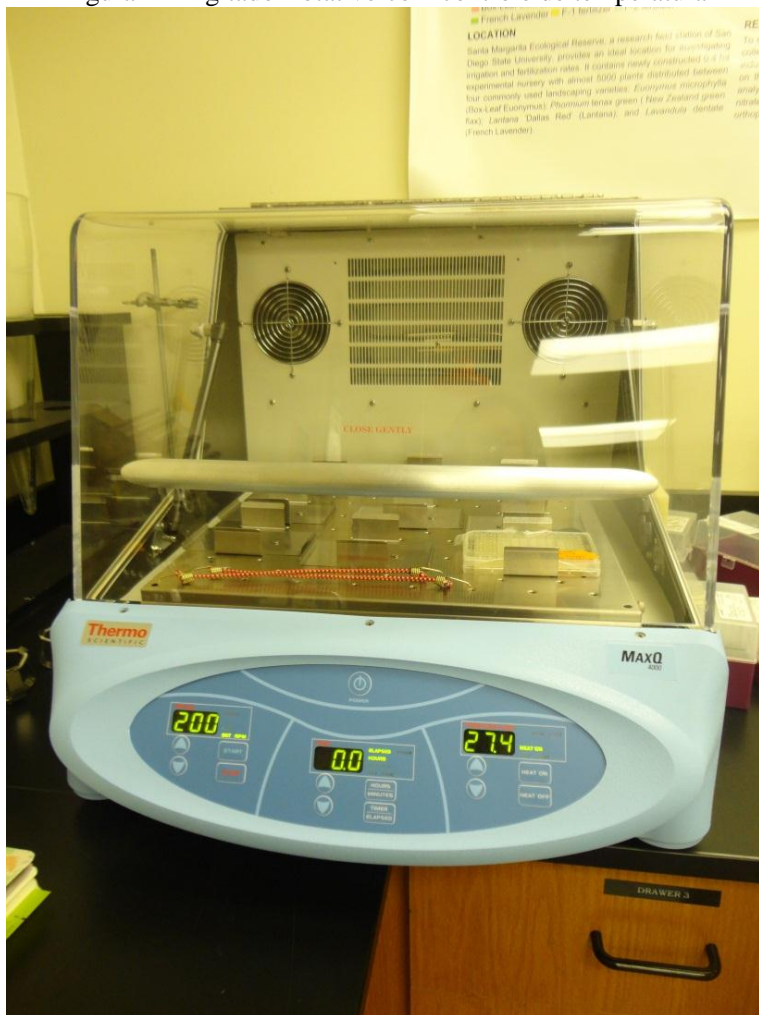
Figura 3 – Placa de 96 alvéolos



Fonte: A autora

As placas usadas para o cultivo diário das bactérias continham aproximadamente 200µl de meio nutritivo líquido, células de *Pseudomonas putida* (~5µl) e diferentes volumes de antibiótico. Todos estes volumes eram aplicados com o auxílio de diferentes pipetas de oito canais. As placas eram deixadas por 24 horas no agitador rotativo (figura 4), a uma temperatura de aproximadamente 30°C, que é a ideal para o crescimento destas bactérias (JATSENKO, 2010), e a uma rotação de 200 rpm. Todos os procedimentos para a preparação destas placas, tanto para o cultivo diário como para os testes de CIM, eram feitos em um ambiente estéril, uma cabine de biossegurança, como pode ser visto na figura 5.

Figura 4 – Agitador rotativo com controle de temperatura



Fonte: A autora

Figura 5 – Cabine de biossegurança com raios UV para esterilização do ambiente interno



Fonte: A autora

4.3 Etapas de Pesquisa

Uma vez tendo-se obtido um cultivo estável da bactéria *Pseudomonas putida*, deu-se início à pesquisa para determinação da resistência adquirida.

4.3.1 Primeira Etapa

A primeira etapa teve por objetivo descobrir como a espécie *Pseudomonas putida* adquire resistência à Ciprofloxacina. A Ciprofloxacina foi preparada e esterilizada com um filtro de 0,2 μm . Ela foi usada em diferentes concentrações em cada coluna de alvéolos das placas. Assim, a primeira coluna era chamada de branco (somente continha meio nutritivo líquido). A segunda coluna era uma coluna de controle, continha o meio de crescimento e bactérias nunca expostas aos antibióticos. Desta maneira, conforme a figura 6, dez concentrações diferentes de antibiótico por placa eram usadas.

Figura 6 – *Layout* da placa onde foi feito o cultivo de bactérias expostas a Ciprofloxacina na primeira fase de pesquisa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047 ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
B	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
C	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
D	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
E	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
F	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
G	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP
H	Meio Nutritivo sem Células	Meio Nutritivo com Células	0.001953 ppm CIP	0.003906 ppm CIP	0.007813 ppm CIP	0.015625 ppm CIP	0.03125 ppm CIP	0.047ppm CIP	0.0625 ppm CIP	0.08735 ppm CIP	0.125 ppm CIP	0.1875 ppm CIP

Fonte: A autora

Para expor as *Pseudomonas putida*, concentrações variando de 0,001953 ppm a 0,1875 ppm foram usadas durante quatro meses de pesquisa. Durante este período de exposição, testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados periodicamente para acompanhar a evolução da resistência ao antibiótico. O método para o teste de CIM está detalhado no item 4.4.

4.3.2 Segunda Etapa

A segunda etapa de pesquisa corresponde ao objetivo de verificar se a espécie *Pseudomonas putida* pode perder sua resistência à Ciprofloxacina. Após seis semanas de exposição, decidiu-se cultivar também bactérias não mais expostas ao antibiótico. Isto foi feito nas mesmas placas de 96 alvéolos, com apenas meio nutritivo líquido e células das bactérias, sem adicionar antibiótico ao meio. Utilizaram-se as bactérias que haviam sido expostas a Ciprofloxacina na primeira etapa a concentrações de 0,125 ppm e 0,1875 ppm.

Assim como na primeira etapa, para se verificar se houve perda de resistência, foram realizados periodicamente testes de CIM. O *layout* das placas da segunda etapa de pesquisa pode ser conferido na figura 7.

Figura 7 – *Layout* da placa onde foi feito o cultivo de bactérias previamente expostas a Ciprofloxacina na segunda fase de pesquisa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
B	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
C	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
D	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
E	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
F	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
G	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									
H	Meio nutritivo sem células	Meio + bactérias previamente expostas a 0.125 ppm CIP	Meio + bactérias previamente expostas a 0.1875 ppm CIP									

Fonte: A autora

4.3.3 Terceira Etapa

A última etapa do teste, iniciada em Novembro de 2012, consistiu de reexpor as mesmas bactérias que haviam parado de ser expostas a Ciprofloxacina por doze semanas (segunda etapa), de modo a verificar quão rapidamente estas poderiam readquirir resistência ao antibiótico, o que corresponde ao último objetivo específico deste trabalho. Isto foi feito cultivando as bactérias nas placas de 96 alvéolos com meio nutritivo líquido e um volume de Ciprofloxacina correspondente a 0,125 ppm e 0,1875 ppm. Assim como nas etapas anteriores fizeram-se testes periódicos de CIM para verificar se as *Pseudomonas putida* estavam tornando-se resistentes novamente. O layout da placa de cultivo da terceira etapa pode ser conferido na figura 8.

Figura 8 – *Layout* da placa onde foi feito o cultivo de bactérias reexpostas a Ciprofloxacina na terceira fase de pesquisa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
B	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
C	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
D	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
E	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
F	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
G	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									
H	Meio nutritivo sem bactérias	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm	Meio + CIP + Bactérias previamente expostas a 0.125 ppm									

Fonte: A autora

4.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Testes de Concentração Inibitória Mínima servem para determinar qual é a quantidade mínima de antibiótico que será capaz de eliminar todas as bactérias. Para testes de CIM foram usadas placas de 96 alvéolos contendo meio nutritivo líquido (~200µl), células de *Pseudomonas putida* (~5µl) e antibióticos (volumes variados).

O procedimento para a determinação do CIM seguiu aquele apresentado na seção 3.5, porém adaptado às melhores condições de crescimento da bactéria estudada. O valor de CIM é determinado como a menor concentração de antibiótico a resultar em um valor de densidade óptica igual ou inferior a aquele encontrado no branco. Esta determinação se dá através da inferência estatística de duas amostras como apresentada na seção 4.8.

O *layout* de placas de CIM é muito semelhante ao *layout* de uma placa de cultivo. É importante ressaltar, contudo, que as concentrações usadas nos testes de CIM sempre são muito maiores que as concentrações usadas no cultivo diário das bactérias. Pode-se conferir na figura 9 um exemplo de *layout* de placa para teste de CIM.

Por exemplo, em certa etapa da pesquisa, concentrações de 14 ppm de Ciprofloxacina chegaram a ser usadas para o teste de CIM. Da mesma maneira que no cultivo, as placas de CIM também atingiam dez concentrações diferentes de antibiótico para testes. Para cada coluna onde eram cultivadas as bactérias de controle (sem antibiótico) e as bactérias expostas (concentrações variadas) fazia-se o teste CIM.

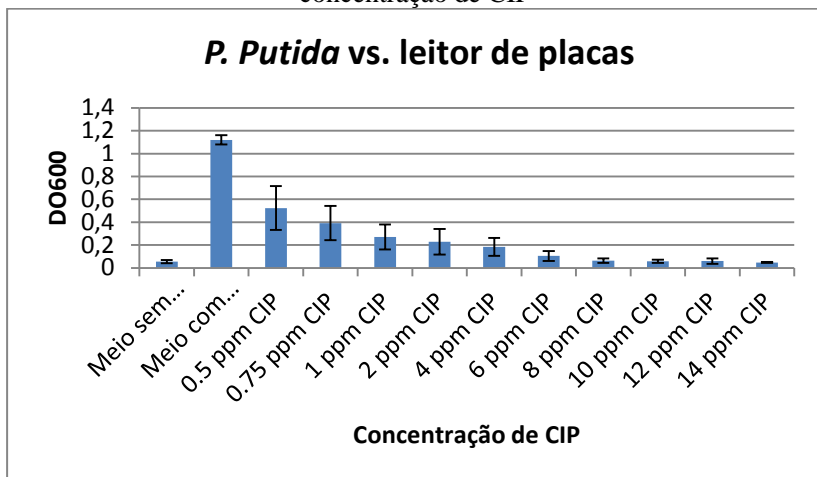
Desta maneira, por exemplo para a primeira etapa, ao se realizar o teste de CIM, faziam-se 11 placas, correspondentes às bactérias de controle e às concentrações de cultivo de 0,001953 ppm a 0,1875 ppm. Cada placa podia testar até 10 concentrações diferentes e aquela coluna em que não se observava crescimento (ou seja, igual à coluna de controle sem células) era a coluna cuja concentração era considerada a Concentração Inibitória Mínima, pois eliminava todas as bactérias. De uma maneira geral, o crescimento observado das bactérias em placas CIM varia conforme o gráfico da figura 10.

Figura 9 - *Layout* modelo da placa de teste de CIM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
B	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
C	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
D	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
E	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
F	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
G	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP
H	Meio sem células	Meio com células	0.5 ppm CIP	0.75 ppm CIP	1 ppm CIP	2 ppm CIP	4 ppm CIP	6 ppm CIP	8 ppm CIP	10 ppm CIP	12 ppm CIP	14 ppm CIP

Fonte: A autora

Figura 10 - Exemplo de gráfico com o crescimento das bactérias vs. concentração de CIP



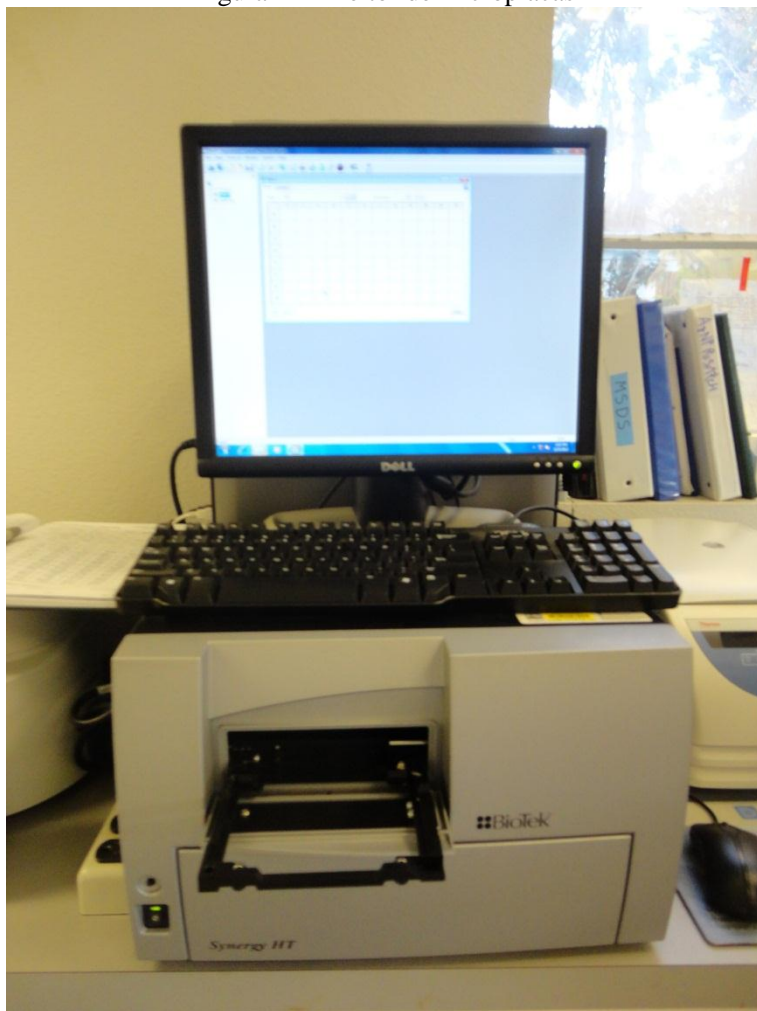
Fonte: A autora

O crescimento das bactérias corresponde ao DO600 no gráfico acima, cujo significado está descrito no item 4.5. Quanto maior a concentração do antibiótico, menos bactérias eram detectadas, até que ao se atingir a Concentração Inibitória Mínima a coluna de bactérias com antibióticos ficava igual à coluna do branco.

4.5 Leitor de Microplacas

DO é a abreviação para Densidade Óptica e o número 600 significa que as placas eram medidas a um comprimento de onda de 600 nanômetros. O leitor de microplacas mede a absorvância de cada um dos alvéolos na placa, de modo a determinar a concentração bacteriana em cada um. Os resultados de DO600 eram associados a uma certa concentração de bactérias, o que demonstrava se as bactérias haviam crescido ou não em cada alvéolo. Os resultados eram obtidos em planilhas que podiam ser exportadas para o programa Excel para posterior análise de resultados. Na figura 11 pode-se observar o leitor de microplacas.

Figura 11 – Leitor de microplacas



Fonte: A autora

4.6 Coleta e Análise Estatística de Dados

Conforme mencionado no item acima, os resultados dos cultivos diários de bactérias e de testes CIM eram obtidos com o auxílio do leitor de microplacas e o *software* Gen5® associado. Os resultados da leitura eram apresentados em uma planilha neste *software* e podiam ser

exportados para o programa Excel. Assim, diariamente eram geradas planilhas em Excel contendo dados variados da pesquisa e estes dados eram armazenados em computadores pessoais e em nuvem. Para poder afirmar que houve um aumento de resistência ao antibiótico, deve-se analisar os resultados de testes CIM. Apenas o fato de que houve um aumento da concentração necessária para eliminar completamente as bactérias não é suficiente para precisar quão significativo foi o aumento de resistência. A análise estatística dos dados obtidos em laboratório foi feita com o auxílio dos programas Excel e Matlab.

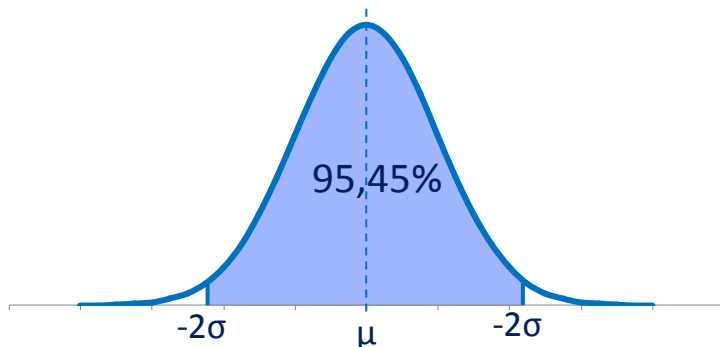
4.6.1 Remoção de *Outliers*

Para que a análise estatística seja confiável, é necessário fazer a remoção de pontos inconsistentes com o resto da amostra, chamados de *outliers*. Uma das fontes de *outliers* era o próprio procedimento de adição de antibiótico. Ao se absorver o antibiótico com os oito canais de uma pipeta simultaneamente, havia casos onde um dos canais absorvia uma quantidade menor que os demais. Isto resultava em valores de DO600 que não correspondiam à amostra. Portanto, a primeira etapa da análise dos dados foi a remoção não tendenciosa do maior valor de DO600 entre os oito valores obtidos em cada coluna de todos os experimentos.

Para experimentos onde havia mais de um ponto de confiabilidade duvidosa, aplicou-se ainda outro filtro estatístico. Medições, de maneira geral, sempre apresentam uma componente aleatória no erro. Esta componente aleatória pode ser mensurada pelo parâmetro conhecido como desvio padrão, representado por σ (ALBERTAZZI, SOUSA, 2008). Este erro aleatório resulta em uma distribuição de probabilidade conhecida como distribuição Gaussiana, ou normal, como a curva da figura 12. A área sob esta curva é unitária.

Um parâmetro útil que pode ser retirado desta curva é a repetitividade. Este parâmetro especifica uma área sob a curva que corresponde a uma probabilidade de o erro aleatório se encontrar dentro dela. É comum o uso de uma repetitividade de 2σ , como apresentado na figura 12. Desta maneira, estima-se com 95,45% de certeza que todo erro aleatório deve encontrar-se na faixa indicada (ALBERTAZZI, SOUSA, 2008). Esta repetitividade foi utilizada para descartar valores de DO600 muito distantes da média.

Figura 12 - Intervalo de 95,45% de confiança, para uma repetitividade de 2σ



Fonte: A autora

4.6.2 Inferência Estatística para Duas Amostras

Para realizar o teste de CIM, é necessário aplicar os conceitos de inferência estatística para duas amostras. Esta análise visa comparar duas amostragens, cada uma com sua média e desvio padrão, e concluir sobre a população representada pela amostra.

Esta inferência é feita a partir de um teste de hipóteses (MONTGOMERY, 2003). A hipótese nula (H_0) sempre propõe que as duas amostras representam populações com médias distantes em δ . A hipótese alternativa (H_1) afirma que as populações têm médias com uma distância diferente de δ , podendo ou não especificar para que lado. Utilizando-se as distribuições de probabilidade de cada amostra, construídas a partir de suas médias e seus desvios padrão, é obtido um parâmetro que representa a chance de uma média ser diferente de outra. Este parâmetro, normalizado, é representado por Z e deve ser comparado com o valor de z referente ao índice de significância (α) escolhido.

Utilizando a tabela 1, é realizada a comparação dos valores para avaliar se a hipótese nula pode ser rejeitada com o nível de confiança escolhido, normalmente em torno de 95%. No caso de uma amostra com poucos valores medidos (abaixo de 30), é utilizado o parâmetro T e a tabela t encontrada no anexo A. Isto se deve ao fato de o desvio padrão da amostra não ser precisamente representativo do desvio padrão da população.

Tabela 1 - Critérios para rejeição da hipótese nula

Hipóteses alternativas	Se σ for conhecido, Rejeite H_0 se	Se σ não for conhecido, Rejeite H_0 se
$\mu_1 - \mu_2 < \delta$	$Z < -z_\alpha$	$T < -t_\alpha$
$\mu_1 - \mu_2 > \delta$	$Z > z_\alpha$	$T > t_\alpha$
$\mu_1 - \mu_2 \neq \delta$	$Z < -z_{\alpha/2}$ ou $Z > z_{\alpha/2}$	$T < -t_{\alpha/2}$ ou $T > t_{\alpha/2}$

Fonte: Adaptado de MONTGOMERY (2003)

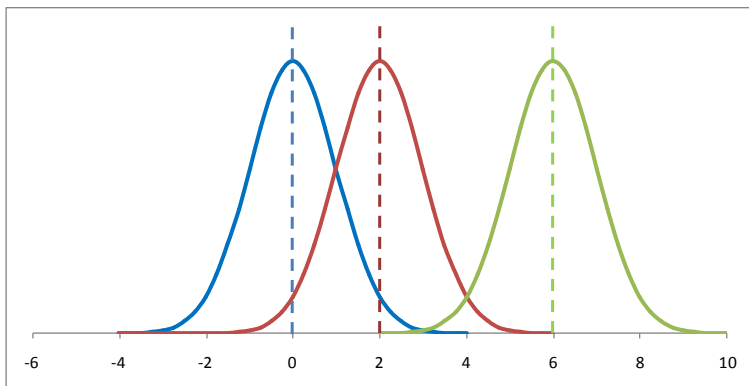
O valor de T é calculado pela equação

$$T = \frac{\mu_1 - \mu_2 - \delta}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}, \quad \text{Eq. (1)}$$

onde μ_1 e μ_2 são as médias das amostras, δ é a distância hipotética entre as médias, S é referente aos desvios padrão das amostras e n_1 e n_2 são os seus graus de liberdade, ou seja, a dimensão da amostra menos um.

Para o teste de CIM, é realizado o teste unilateral, apenas verificando se o valor da concentração em questão é maior que aquele encontrado no branco com 95% de certeza. A primeira concentração que não conseguir rejeitar a hipótese nula, ou seja, não for capaz de afirmar que o valor é maior que o valor do branco, é assumida como CIM. A Figura 13 apresenta três resultados teóricos com o mesmo desvio padrão. Pode-se afirmar com certeza que a curva verde é maior que a azul. Já a curva vermelha está próxima o suficiente da curva azul para possibilitar que as duas apresentem na realidade a mesma média. Isto ilustra o que ocorre durante a determinação do CIM. No caso, a concentração que gerou a curva vermelha seria considerada como Concentração Inibitória Mínima.

Figura 13 - Três amostras teóricas com mesmo desvio padrão e médias diferentes



Fonte: A autora

5 RESULTADOS

A seguir são apresentados os resultados para as populações expostas a variadas concentrações de Ciprofloxacina durante o período de 27/07/12 a 29/11/12. São apresentados apenas os resultados de seis populações, pois não foram feitos testes para as demais populações até o final do período mencionado.

Em seguida são discutidos os resultados para as duas populações que pararam de ser expostas ao antibiótico a partir do dia 24/08/12. Estes resultados também são comparados aos resultados das populações originalmente expostas ao antibiótico.

5.1 Resultados das Populações Expostas – Primeira Etapa

As figuras 15 a 20 apresentam os resultados de testes de CIM de seis populações expostas a concentrações diferentes de Ciprofloxacina, a saber: 0,001953 ppm, 0,003906 ppm, 0,007813 ppm, 0,03125 ppm, 0,125 ppm e 0,1875ppm, respectivamente. Os intervalos entre testes consecutivos variaram de poucos dias a algumas semanas.

Foram observados em todos os testes altos níveis de dispersão dos resultados ao longo do tempo. Ainda, frequentemente encontraram-se alvéolos individuais com valores muito distantes dos demais. Como era esperado, isto se deve à distribuição irregular de antibiótico através do procedimento de pipetagem utilizado. No entanto, foi observado que o procedimento estatístico de retirada de *outliers* apresentado na seção 4.6.1 foi capaz de filtrar estas ocorrências.

Outro motivo para os altos níveis de dispersão seria uma possível contaminação na própria pipeta utilizada para aplicação do meio nutriente líquido, pois esta não era esterilizada com frequência e também era utilizada para retirar as células velhas das placas. Contudo, sempre eram utilizadas pontas de pipetas novas para todos os procedimentos. Também pode ter ocorrido uma contaminação no próprio frasco do meio nutriente líquido, o que então somente poderia ser comprovado no dia seguinte ao se observar o frasco.

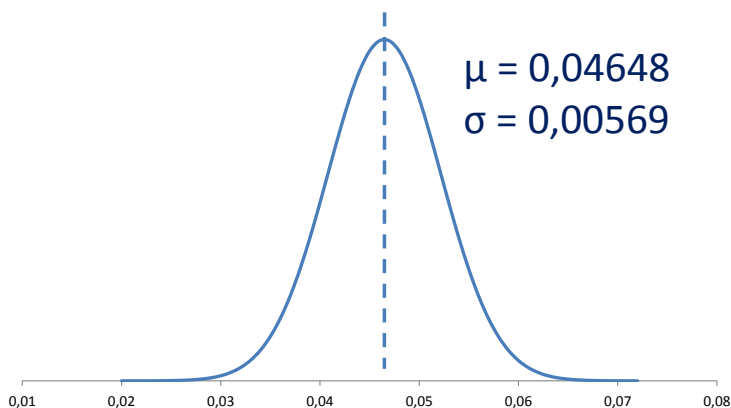
Ainda, o comportamento da densidade óptica medida na coluna do branco foi de caráter duvidoso, pois apresentou contaminações tanto em alvéolos individuais quanto em colunas inteiras. Isto se deve ao fato de que durante o procedimento de pipetagem de células na coluna do lado, gotículas do líquido contendo as bactérias do controle podem ter caído nos alvéolos da coluna do branco. Ainda, os mesmos motivos de

contaminação da pipeta e/ou do meio nutritivo líquido podem ter sido a causa de colunas de branco com resultados irregulares.

Estas pequenas contaminações resultavam em altos valores de densidade óptica, pois na coluna do branco não havia antibióticos para conter a proliferação das bactérias. A contaminação por respingos tem pouca influência nos resultados das populações estudadas nas demais colunas da placa, por dois motivos: Primeiramente devido ao fato de que as colunas restantes já apresentavam uma alta concentração de sua própria população de bactérias, que possuíam resistências semelhantes às suas vizinhas. Ainda, porque estas colunas eram submetidas a altas concentrações de antibióticos para a realização do teste de CIM.

Portanto, foi necessária a substituição do valor do branco para os testes de inferência estatística. Ao invés de comparar o valor de densidade óptica de cada população estudada com o branco da mesma placa, foi utilizado um valor padrão para a coluna do branco. Este valor padrão foi obtido calculando a média e o desvio padrão de 64 medições de densidade óptica de colunas do branco livres de contaminação. A figura 14 mostra a distribuição dos valores de branco.

Figura 14 - Distribuição do branco em unidades de DO600



Fonte: A autora

A figura 15 apresenta os resultados dos testes de CIM para a população exposta a 0,001953 ppm de Ciprofloxacina, que foi a menor concentração de exposição testada. O valor escuro no gráfico representa um teste de CIM onde mesmo a maior concentração de antibiótico testada não foi capaz de eliminar as bactérias, ou seja, de reduzir a

densidade óptica medida ao nível do branco. No entanto, o valor de CIM do ponto em questão é próximo ao máximo valor testado, visto que os valores de densidade óptica obtidos para esse ponto são apenas levemente maiores que a média do branco.

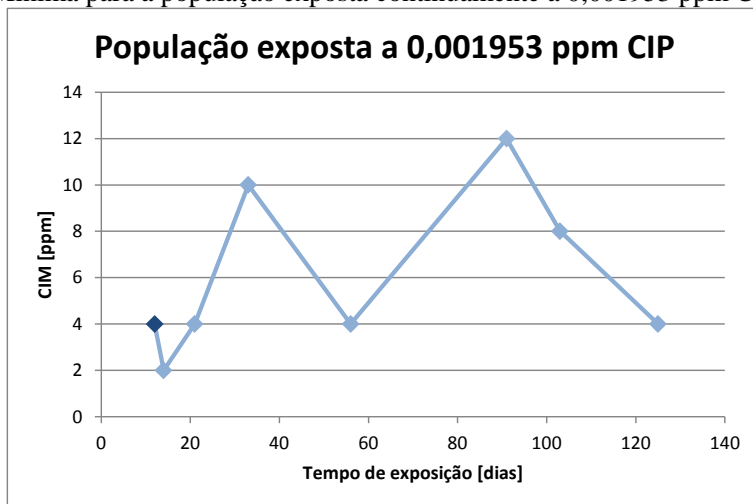
Pode-se observar no gráfico a dispersão dos resultados no tempo. O valor de CIM oscilou bastante ao longo do período de testes, apresentando saltos em testes consecutivos. Durante o período de estudos foi observado um aumento de resistência ao antibiótico por parte da população de *Pseudomonas putida*, no entanto este aumento foi inconsistente, o que dificulta uma análise conclusiva do comportamento desta população. Esta análise também é dificultada devido à pouca frequência dos testes de CIM, que por sua vez é consequência das limitações do método experimental, que demandava muito tempo para sua realização.

A figura 16 mostra o comportamento da população exposta diariamente a 0,003906 ppm de Ciprofloxacina. Os resultados são muito semelhantes aos resultados da população anterior, tanto em comportamento como nos valores de concentração inibitória mínima.

Da mesma maneira, o comportamento observado na figura 17 para a população exposta a 0,007813 ppm de Ciprofloxacina também é bastante semelhante. Quando se compara estas três populações às próximas populações percebe-se que houve uma anomalia no teste de CIM entre os dias 40 e 60 de exposição. Uma vez que as três primeiras populações foram testadas em dias diferentes das demais, esta anomalia deve-se provavelmente a um erro de execução no procedimento experimental.

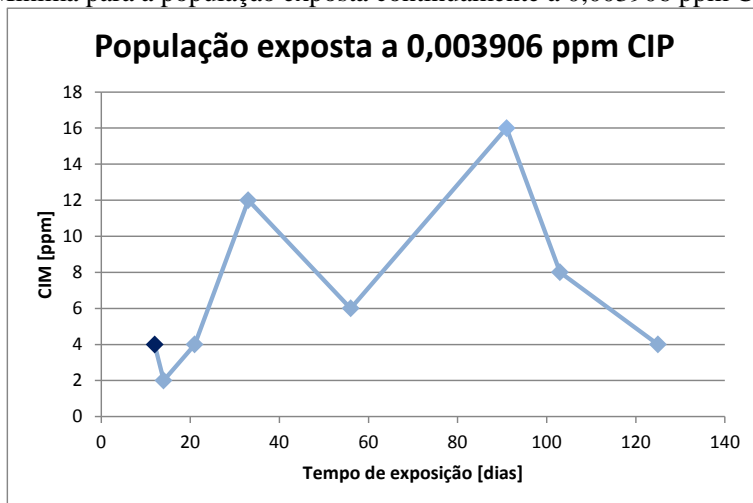
Uma das possíveis causas é uma falha humana no momento de pipetar o antibiótico. A Ciprofloxacina utilizada nos experimentos é um antibiótico líquido e transparente, sempre aplicada após o preechimento dos alvéolos com o meio de crescimento líquido. Desta forma, uma inspeção visual é incapaz de dizer se o antibiótico já foi adicionado aos alvéolos, pois a quantidade usada é muito pequena. Isto abre a possibilidade de, por descuido, o antibiótico ter sido aplicado duas vezes neste dia.

Figura 15 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,001953 ppm CIP



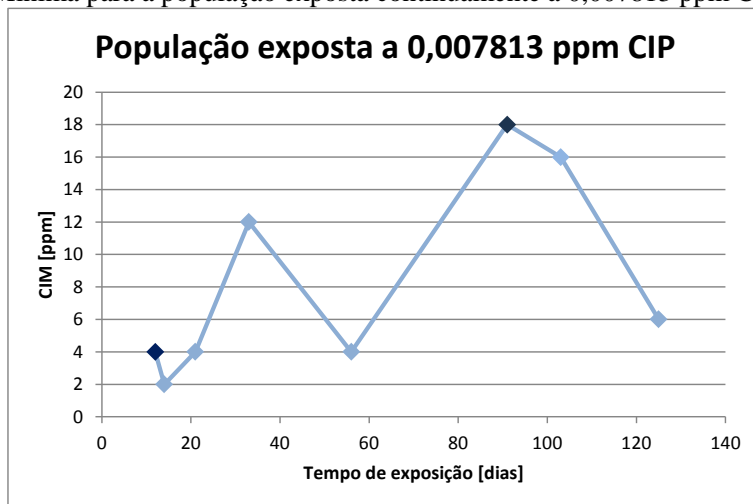
Fonte: A autora

Figura 16 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,003906 ppm CIP



Fonte: A autora

Figura 17 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,007813 ppm CIP



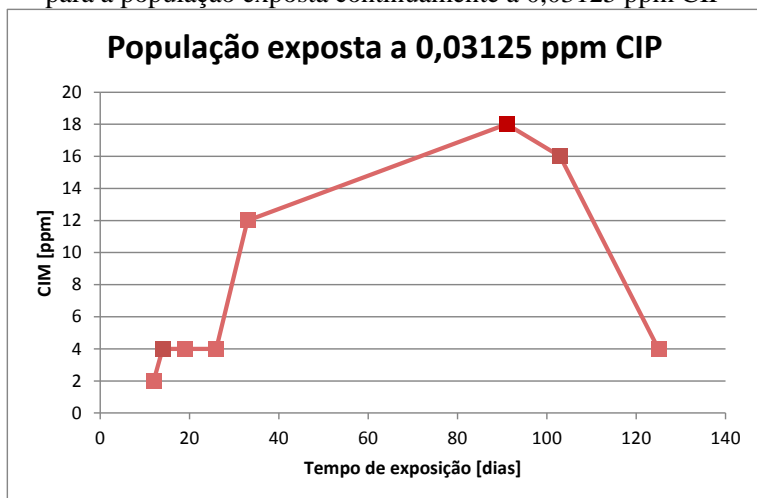
Fonte: A autora

A figura 18 apresenta os resultados de testes de CIM para a população bacteriana exposta a 0,03125 ppm de Ciprofloxacina. Pode-se observar no gráfico que esta população não apresentou uma queda de valor de concentração inibitória mínima no teste realizado entre os dias 40 e 60 de exposição. Isto se deve ao fato de que, devido ao grande volume de trabalho, os testes de CIM das três primeiras populações eram feitos em dias diferentes das três demais populações.

Esta população também apresentou um atraso de aproximadamente três semanas até adquirir uma resistência significativa. Esta resistência adquirida foi bem clara até próximo do centésimo dia, quando a população sofreu uma queda inesperada de resistência. Esta redução foi também encontrada em todas as outras populações e será discutida mais adiante.

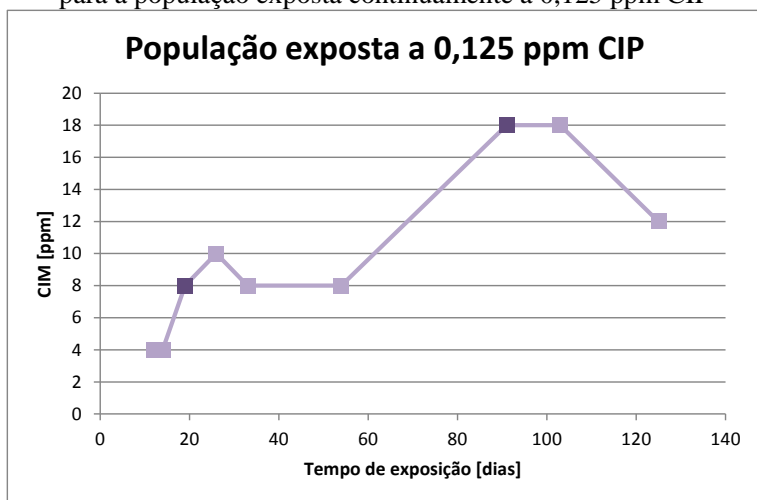
Na figura 19 estão apresentados os resultados dos testes de CIM para a população exposta a 0,125 ppm de Ciprofloxacina. Esta população apresentou um atraso ainda maior para adquirir uma resistência alta. Todavia, sua queda de resistência nos últimos testes foi consideravelmente menor quando comparada às populações anteriores. Por fim, a aquisição de resistência ao longo do tempo é claramente observada.

Figura 18 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,03125 ppm CIP



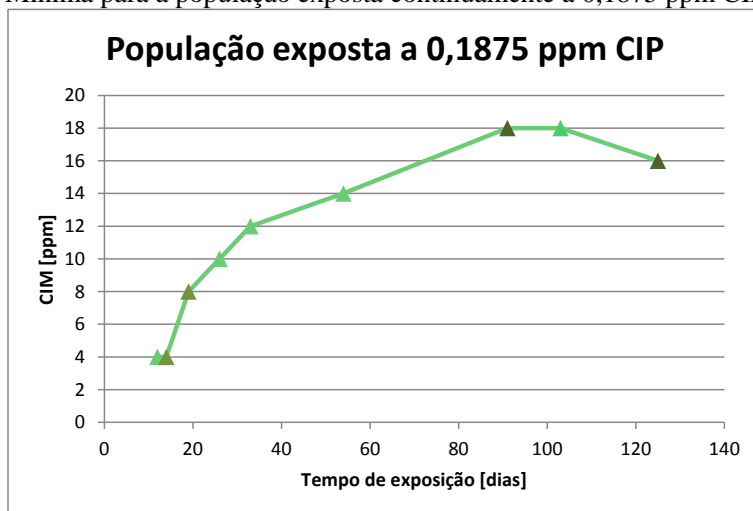
Fonte: A autora

Figura 19 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,125 ppm CIP



Fonte: A autora

Figura 20 - Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta continuamente a 0,1875 ppm CIP



Fonte: A autora

A figura 20 apresenta a curva de resistência da população exposta a 0,1875 ppm de Ciprofloxacina ao longo do tempo. Esta foi a população submetida à maior concentração de antibiótico. Esta também foi a população com o crescimento mais ordenado e é a população que apresentou uma queda menor após o centésimo dia de exposição. De maneira semelhante às demais populações, esta necessitou de aproximadamente três semanas de exposição contínua até apresentar uma resistência visível. Finalmente, após as três semanas, esta população também apresentou um aumento de resistência rápido e definitivo.

Finalmente, as figuras 21 e 22 comparam os resultados já discutidos para as populações expostas a 0,001953 ppm CIP, 0,03125 ppm CIP e 0,1875 ppm CIP. Como pode ser visto, a queda nos últimos dois testes de CIM foi encontrada em todas as populações.

Após maior investigação, foi identificado que os dois últimos testes de CIM coincidiram com dois períodos de recesso do laboratório onde foi efetuada a pesquisa. Durante estes períodos de recesso as bactérias não foram cultivadas diariamente, mas permaneceram em uma câmara fria. Ao retornar à rotina de cultivo, as bactérias apresentaram uma inércia na taxa de reprodução. Portanto, diminuindo os valores de antibióticos necessários para eliminar completamente a população. O

segundo período de recesso foi mais longo e seu impacto pode ser observado nas quedas maiores das concentrações inibitórias mínimas de cada população.

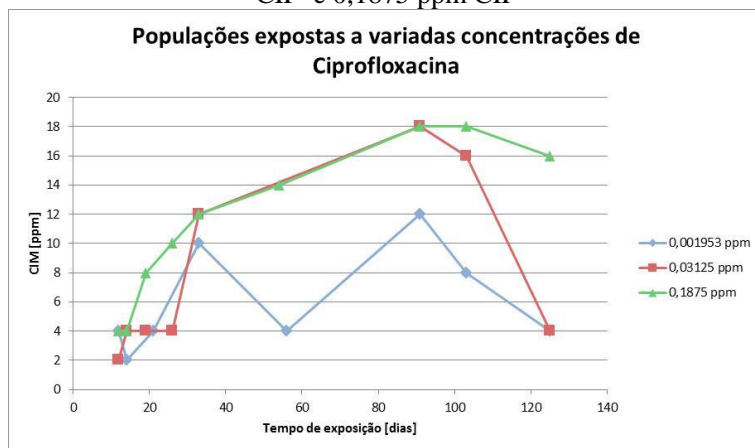
Os resultados para os últimos dois testes de CIM para todas as populações não são representativos do desenvolvimento regular do mecanismo de resistência das *Pseudomonas putida* ao longo do tempo. Todavia, estes resultados servem para um propósito de comparação entre as diversas populações. Diferenças que antes eram pequenas, frequentemente devido a testes de CIM que ultrapassaram o valor máximo testado, ficaram mais evidentes após os efeitos da inércia das bactérias.

Ao observar as comparações entre as populações expostas a baixa, média e alta concentrações de antibiótico fica clara a diferença entre as resistências médias adquiridas por cada população. Enquanto as populações de alta e média concentrações exibem um aumento de resistência visível, a população exposta a uma baixa concentração possui um comportamento oscilatório e incerto.

Da mesma maneira, nota-se que a concentração de antibiótico aplicada exerce forte influência sobre o comportamento do aumento de resistência. Populações submetidas a concentrações maiores apresentaram um comportamento mais regular na aquisição de resistência. Antes de iniciar os estudos a resposta das populações às variadas concentrações de antibiótico era de difícil previsão. Por este motivo, foram testadas concentrações de ordens de grandeza bastante diferentes, como por exemplo a diferença entre as concentrações de 0,001953 ppm e 0,1875 ppm.

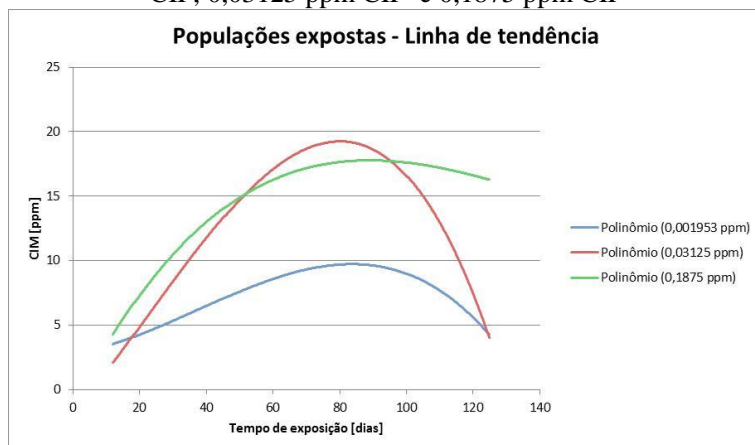
O comportamento irregular dos testes de concentração inibitória mínima deve-se fortemente ao nível de incerteza dos próprios testes estatísticos empregados na determinação da CIM. A diferença de densidade óptica medida para altas concentrações de antibióticos é muito pequena, sendo menor que o desvio padrão destas. Assim, é possível que a CIM determinada pela inferência estatística varie bastante em torno do valor correto. A figura 23 apresenta um exemplo de teste de CIM onde pode ser observada a pequena variação de DO para altas concentrações de antibiótico.

Figura 21 - Comparação dos resultados de CIM ao longo do tempo entre as populações expostas a 0,001953 ppm CIP, 0,03125 ppm CIP e 0,1875 ppm CIP



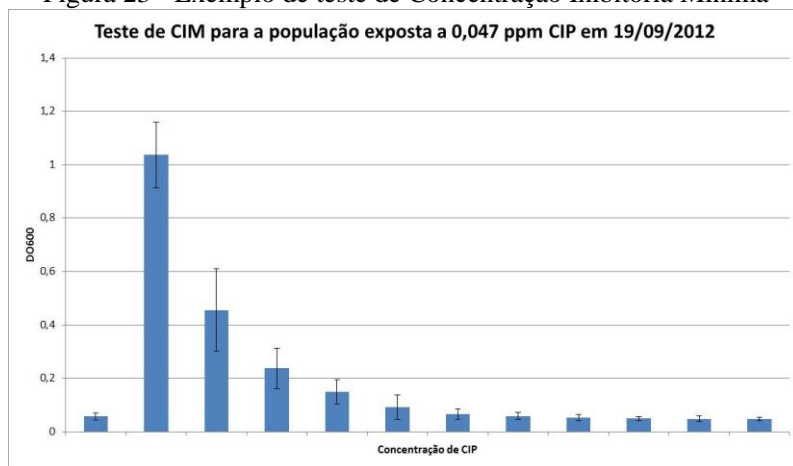
Fonte: A autora

Figura 22 - Comparação das linhas de tendência para os resultados de CIM ao longo do tempo entre as populações expostas a 0,001953 ppm CIP, 0,03125 ppm CIP e 0,1875 ppm CIP



Fonte: A autora

Figura 23 - Exemplo de teste de Concentração Inibitória Mínima



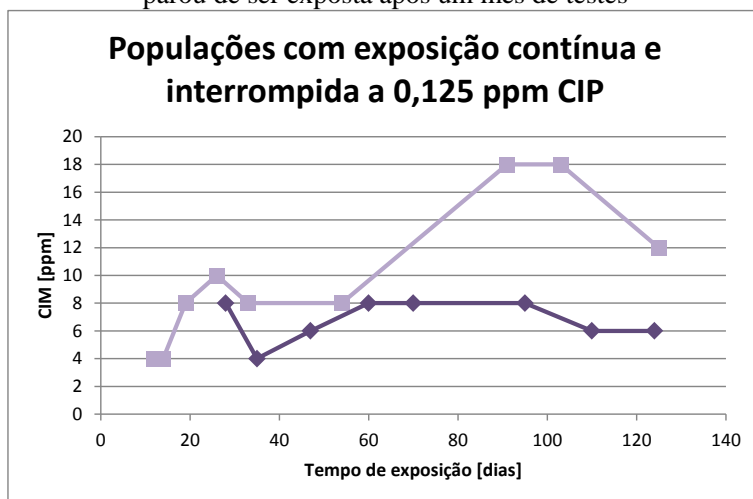
Fonte: A autora

5.2 Resultados das Populações de Exposição Interrompida – Segunda Etapa

A figura 24 apresenta os testes de CIM para a população que havia sido exposta a 0,125 ppm de Ciprofloxacina por um mês aproximadamente antes de cessar a exposição. Os resultados são mostrados juntos aos resultados já discutidos para a mesma população continuamente exposta. É possível observar no gráfico a clara diferença entre as resistências das duas populações ao longo do tempo.

Em primeiro lugar estes resultados confirmam a hipótese de que a contínua exposição ao antibiótico acarreta um aumento da resistência das bactérias a este. Ainda, é possível observar que a interrupção da exposição não resulta em uma perda clara da resistência nas semanas seguintes. Para um processo onde diversos fatores contribuem para a flutuação dos resultados, os valores de CIM foram relativamente próximos à média ao longo de quase três meses.

Figura 24 – Resultados de teste de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta a 0,125 ppm CIP e também a mesma população que parou de ser exposta após um mês de testes

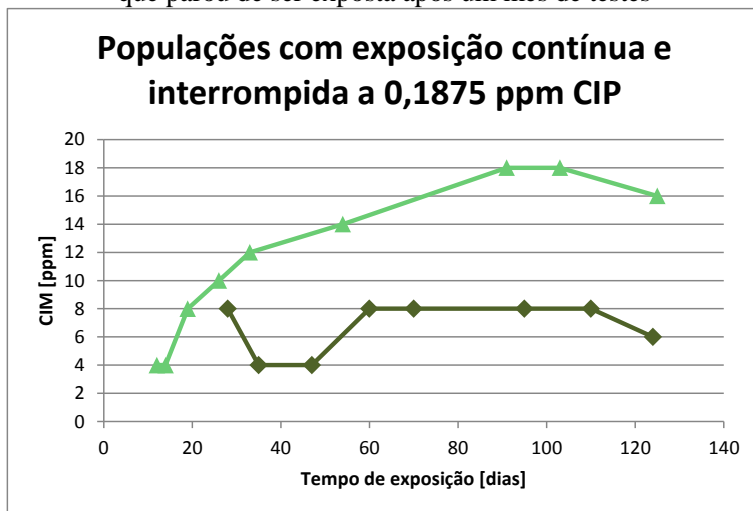


Fonte: A autora

A figura 25 apresenta os mesmos resultados, porém para a população originalmente exposta a 0,1875 ppm CIP. De maneira semelhante, a resistência da população não mais exposta não sofreu aumento ao longo do tempo e apresentou um comportamento bastante regular. Ainda, também fica claro o efeito da aplicação do antibiótico no aumento de resistência das bactérias.

É importante afirmar que os resultados apresentaram um maior desvio padrão resultando em alguns testes de CIM com valores acima do máximo testado. Não obstante, acredita-se que os valores reais de CIM não diferem muito daqueles aqui apresentados.

Figura 25 – Resultados de teste de Concentração Inibitória Mínima para a população exposta a 0,1875 ppm CIP e também a mesma população que parou de ser exposta após um mês de testes



Fonte: A autora

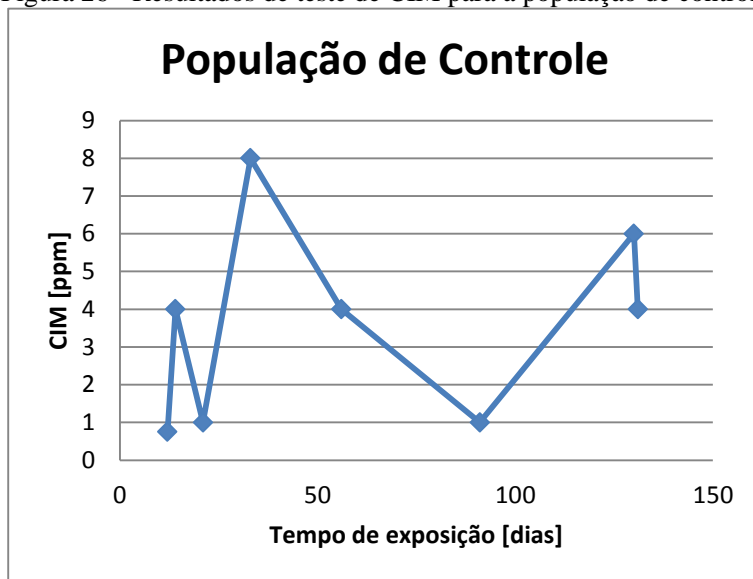
5.3 Resultados das Populações Reexpostas – Terceira Etapa

O início do cultivo das populações reexpostas deu-se no dia 13/11/12. Até o final do período de pesquisa, tão somente três testes de CIM foram feitos para estas populações. Assim sendo, não foi possível obter resultados significativos sobre esta etapa da pesquisa e recomenda-se continuar estes testes por mais tempo para obter mais dados.

5.4 Resultados dos Testes de CIM do Controle

A figura 26 apresenta os valores de concentração inibitória mínima para a população de controle. Ao longo dos quatro meses de pesquisa, esta população não foi exposta a nenhuma quantidade de Ciprofloxacina. Observa-se no gráfico que não houve um aumento claro da resistência ao longo do tempo, pois esta oscilou entre valores próximos a 4 ppm CIP até o fim do estudo. Contudo, os valores de CIM do controle foram muito mais dispersos do que o esperado. Assim como o branco, o controle está mais suscetível a sofrer com as contaminações dos processos de pipetagem de antibiótico da coluna vizinha, bem como da aplicação de células mais resistentes.

Figura 26 - Resultados de teste de CIM para a população de controle



Fonte: A autora

5.5 Resultados da Esterelização

Para o cultivo de células e para os testes de CIM, são utilizadas placas de 96 alvéolos, conforme já mencionado. Para evitar o descarte diário de várias placas, desenvolveu-se um procedimento de esterilização destas, de modo a reutilizá-las. O procedimento consiste de pipetar as células de experimentos finalizados para um frasco coletor, para então lavar a placa com água e detergente. Depois disto, a placa era enxaguada três vezes com água deionizada, para então ser utilizada no dia seguinte após a secagem. Uma vez seca, a placa era exposta a raios UV por quinze minutos.

Para se ter certeza de que o método de esterilização destas placas funcionava, foram feitos testes que consistiam de aplicar meio nutritivo líquido em todos os alvéolos nas placas já esterilizadas e fazer a leitura de DO no dia seguinte. Os resultados obtidos mostraram que os alvéolos não tiveram crescimento de bactérias.

6 CONCLUSÕES

Na primeira etapa de pesquisa laboratorial foram feitos testes de concentração inibitória mínima para várias populações de *Pseudomonas putida*. Seis populações foram expostas continuamente a diferentes concentrações de Ciprofloxacina, a saber: 0,001953 ppm, 0,003906 ppm, 0,007813 ppm, 0,03125 ppm, 0,125 ppm e 0,1875ppm. Destes experimentos, observou-se que:

- ✓ Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima tiveram altos níveis de dispersão, o que ocorreu devido a limitações do método experimental;
- ✓ Três principais motivos foram levantados para explicar a alta dispersão dos resultados: distribuição irregular do antibiótico nos oito canais da pipeta, contaminação da pipeta e contaminação do meio nutritivo líquido;
- ✓ O método estatístico para determinação de *outliers* foi capaz de filtrar os resultados com relativo sucesso;
- ✓ Os resultados de densidade óptica para a coluna do branco foram frequentemente irregulares. Isto se deve ao fato de o branco ser altamente sensível a quaisquer contaminações;
- ✓ Para as populações submetidas a baixas concentrações de Ciprofloxacina obteve-se um comportamento oscilatório no tocante ao desenvolvimento de resistência. Embora o aumento da resistência tenha sido evidente, os resultados dificultaram a quantificação deste aumento;
- ✓ Uma das limitações do método é a baixa frequência de realização dos testes de concentração inibitória mínima. A baixa resolução ao longo do tempo dificultou classificar os resultados como dispersos ou realmente oscilatórios;
- ✓ Para as três primeiras populações apresentadas, houve uma anomalia próxima ao dia 60 de pesquisa, provavelmente ligada a uma má execução dos testes;

- ✓ Para as populações submetidas a concentrações maiores de Ciprofloxacina, o aumento da resistência foi mais evidente;
- ✓ Também observou-se que o comportamento da resistência ao longo do tempo foi mais regular para estas populações;
- ✓ Todas as populações apresentaram um período de aproximadamente três semanas para um aumento significativo da resistência ao antibiótico;
- ✓ Ainda, todas estas populações apresentaram também uma queda nas últimas semanas de experimentos, ligadas aos períodos de recesso do laboratório. Estes resultados, embora não representem o desenvolvimento da resistência ao longo do tempo, servem para comparação entre as populações;
- ✓ O comportamento dos testes de concentração inibitória mínima teve sua incerteza principalmente ligada ao alto desvio padrão das amostras, o que dificultava a inferência estatística através do método proposto;
- ✓ Embora uma análise quantitativa do aumento de resistência seja difícil, ficou clara a influência da quantidade de antibiótico aplicada no comportamento do aumento de resistência das bactérias.

Na segunda etapa foram realizados os testes de concentração inibitória mínima em populações que deixaram de ser expostas diariamente à Ciprofloxacina. Destes experimentos, foi possível concluir que:

- ✓ Foi possível notar uma clara diferença entre as populações de bactérias continuamente expostas a uma concentração e as populações que tiveram exposição interrompida;
- ✓ Estes resultados confirmam a hipótese do aumento da resistência devido à exposição a antibiótico para as bactérias da espécie *Pseudomonas putida*;

- ✓ Ainda, é possível concluir que as bactérias *Pseudomonas putida* não perdem totalmente sua resistência a Ciprofloxacina no espaço de três meses.

Também foram realizados, na terceira etapa, os experimentos de reexposição das *Pseudomonas putida* que tinham tido a exposição interrompida. Destes experimentos foi possível observar que:

- ✓ Com o baixo número de testes realizados não foi possível obter resultados conclusivos.

Ainda, foram realizados testes de concentração inibitória mínima do da população de controle durante os quatros meses de pesquisa. Com estes resultados, chega-se às seguintes conclusões:

- ✓ A coluna de controle apresentou alta dispersão de resultados, provavelmente por ser mais suscetível a contaminações, de maneira semelhante à coluna do branco;

Não foi possível um aumento de resistência claro ao longo do período, porém os valores de concentração inibitória mínima variaram mais do que o previsto.

Por fim, os testes de esterilização de placas realizados no início do período de pesquisa resultaram na seguinte conclusão:

- ✓ O método de esterilização utilizado é apropriado.

O trabalho foi bem sucedido em sua proposta de avaliar o impacto da presença da Ciprofloxacina no meio ambiente em populações de *Pseudomonas putida*. Uma vez que as concentrações usuais de antibióticos em efluentes e rios são menores do que as concentrações testadas, conforme as pesquisas bibliográficas, é possível afirmar que a Ciprofloxacina não é capaz de promover um aumento alarmante da resistência destas bactérias em um período de quatro meses.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto aos objetivos listados na seção 2, pode-se afirmar que estes foram alcançados. Os primeiros objetivos foram alcançados através da pesquisa bibliográfica. Os objetivos relativos à capacidade da *Pseudomonas putida* adquirir resistência à Ciprofloxacina foram atingidos durante a etapa laboratorial, como pôde ser observado por meio das conclusões discutidas na seção anterior.

Para trabalhos futuros que pretendam aprimorar ou dar continuidade a esta linha de pesquisa, sugere-se:

- Cultivar um número menor de populações expostas a concentrações diferentes, de modo a poder separar as colunas do branco e do controle das demais colunas em uma mesma placa, evitando possíveis contaminações;
- Conservar o meio de crescimento líquido em diversos frascos individuais menores, de modo a reduzir o impacto de uma contaminação;
- Realizar com maior frequência os testes de concentração inibitória mínima e por um período mais prolongado, principalmente para as populações reexpostas ao antibiótico;
- Ter pipetas diferentes para a aplicação de meio nutritivo líquido e para a retirada de células velhas das placas para lavagem;
- Realizar experimentos semelhantes com diferentes antibióticos;
- Verificar o comportamento real da espécie *Pseudomonas aeruginosa* em relação à presença da Ciprofloxacina;
- Testar concentrações menores e mais próximas àquelas encontradas em rios e efluentes.

REFERÊNCIAS

- ALBERTAZZI JR, A.; SOUSA, A. R. de. **Fundamentos de metrologia científica e industrial**. 1ª ed, Barueri-SP: Manole, v. 1, 405p, 2008.
- CHO, J.; TIEDJE, J. M. **Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil**. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 12, p. 5448–5456, Dezembro de 2000.
- FRUMKIN, H. **Environmental health: from global to local**. 2nd ed. EUA: Jossey-Bass, 2010.
- GIGER et al. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia*, 57, N° 9, p. 485-491, 2003.
- GILARDI, G. L. **Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens**. Applied Microbiology, Vol. 21, N° 3, p. 414-419, Março de 1971.
- HORII, T.; MURAMATSU, H.; IINUMA, Y. **Mechanisms of resistance to fluoroquinolones and carbapenems in *Pseudomonas putida***. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56, p. 643–647, 2005.
- JATSENKO *et al.* **Molecular characterization of Rif mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida***. Mutation Research, n° 683, p. 106–114, 2010.
- KEEN, P. L.; PATRICK, D. M. **Tracking change: A Look at the Ecological Footprint of Antibiotics and Antimicrobial Resistance**. Antibiotics Journal, vol. 2, p. 191-205, 2013.
- KELKAR, P. S.; LI, J. T. C. **Cephalosporin allergy**. The New England Journal of Medicine, Vol. 345, No. 11, Setembro de 2001.

- KIM *et al.* **Nosocomial *Pseudomonas putida* bacteremia**: High rates of carbapenem resistance and mortality. Chonnam Medical Journal, 48, p. 91-95, 2012.
- LOUIE *et al.* **Ciprofloxacin**: an oral quinolone for the treatment of infections with gram-negative pathogens. Canadian Medical Association Journal, 150, 5, p. 669-676, 1994.
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. **Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water**. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 201, p. 71-115, 2009.
- MESAROS *et al.* ***Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium**. Clinical Microbiology and Infection, Volume 13, Issue 6, p. 560–578, Janeiro de 2007.
- MONTGOMERY, D. C.; **Applied statistics and probability for engineers**. 3^a ed. JOHN WILEY & SONS, INC., 2003.
- NELSON *et al.* **Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440**. Environmental Microbiology, 2002, vol. 4, issue 12, p. 799–808.
- PEREZ, F.; DUIN D. V. **Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A menace to our most vulnerable patients**. Cleveland Clinic Journal of Medicine, Volume 80, N° 4, Abril de 2013.
- PRADO *et al.* **Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant**. Letters in Applied Microbiology, 46, p. 136–141, 2008.
- RAY, G. C.; RYAN, K. J. (Editores). **Sherris medical microbiology**. 4th ed. MCGRAW-HILL, 2004.
- SHEN, L.; MA, Y.; LIANG, H. **Characterization of a novel gene related to antibiotic susceptibility in *Pseudomonas***

aeruginosa. The Journal of Antibiotics 65, p. 59-65, Fevereiro de 2012.

- SORENSEN, J.; JENSEN; L. E.; NYBROE, O. **Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies.** Plant and Soil Journal, Volume 232, Issue 1-2, pp 97-108, Maio de 2001.
- VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. **Versatility of aminoglycosides and prospects for their future.** Clinical Microbiology Reviews, Vol. 16, N° 3, p. 430-450, Julho de 2003.
- VARGAS, Jaime Alberto López; TORO, Lina María Echeverri. ***K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”?** Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistência. Iatreia, Vol. 23, No. 2, Junho de 2010.
- WAINWRIGHT, M.; AMARAL, L. **Photobactericides — A local option against multi-drug resistant bacteria.** The Journal of Antibiotics 2, p. 182-190, Março de 2013.
- WERNER *et al.* **Unnecessary use of fluoroquinolone antibiotics in hospitalized patients.** BMC Infectious Diseases, 11, 187, 2011.
- WIEGAND, I.; HILPERT, K.; Hancock, R. E. W. **Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.** Nature Protocols, Vol. 3. No.2, p. 163-175, 2008.
- WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. **Fluoroquinolone antimicrobial agents.** Clinical Microbiology Reviews, Vol. 2, N° 4, p. 378-424, Outubro de 1989.
- WOLSKA, K.; KOT, B.; JAKUBCZAK, A. **Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitals in Siedlce (Poland).** Brazilian Journal of Microbiology, p. 274-282, 2012.

ANEXO A - Tabela de t de Student

Tabela 2 - Tabela de t de Student

α v	0,4	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	0,325	1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	127,32	318,31	636,62
2	0,289	0,816	1,886	2,92	4,303	6,965	9,925	14,089	23,326	31,598
3	0,277	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,213	12,924
4	0,271	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,61
5	0,267	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,893	6,869
6	0,265	0,718	1,44	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,263	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,262	0,706	1,397	1,86	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,261	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,25	3,69	4,297	4,781
10	0,26	0,7	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,26	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,259	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,93	4,318
13	0,259	0,694	1,35	1,771	2,16	2,65	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,258	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,14
15	0,258	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,258	0,69	1,337	1,746	2,12	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,257	0,689	1,333	1,74	2,11	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,257	0,688	1,33	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,61	3,922
19	0,257	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,257	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,85
21	0,257	0,686	1,323	1,721	2,08	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,256	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,256	0,685	1,319	1,714	2,069	2,5	2,807	3,104	3,485	3,767
24	0,256	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,256	0,684	1,316	1,708	2,06	2,485	2,787	3,078	3,45	3,725
26	0,256	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,256	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,69
28	0,256	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,256	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,659
30	0,256	0,683	1,31	1,697	2,042	2,457	2,75	3,03	3,385	3,646
40	0,255	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
60	0,254	0,679	1,296	1,671	2	2,39	2,66	2,915	3,232	3,46
120	0,254	0,677	1,289	1,658	1,98	2,358	2,617	2,86	3,16	3,373
Inf.	0,253	0,674	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	2,807	3,09	3,291

Fonte: MONTGOMERY (2003).